

博士学位論文

治療用タンパク質の細胞間拡散 を利用した遺伝子治療法による抗腫瘍効果 に関する研究

令和2年度

昭和薬科大学大学院 薬学研究科

薬学専攻 博士課程

薬剤学研究室

狩野 順平

【目次】

【緒論】	1
【本論】	
第1章 治療用タンパク質の細胞間拡散が及ぼす遺伝子治療効果への影響	5
第1節 治療用タンパク質の細胞間拡散による治療効果への影響	6
第1項 コレラ毒素Aサブユニットを融合した細胞間拡散タンパク質の機能 評価	7
第2項 担がんマウスにおける遺伝子導入細胞からの治療用タンパク質の 細胞間拡散による治療効果	11
第3項 免疫組織染色による腫瘍組織内の観察	18
第4項 担がんマウスにおける治療用タンパク質発現プラスミド投与による 治療効果	20
第2節 抗 knob 抗体による細胞間拡散タンパク質機能への影響	23
第1項 組換え knob タンパク質投与マウスにおける抗 knob 抗体産生の確認	24
第2項 <i>in vitro</i> における抗 knob 抗体存在下の細胞間拡散タンパク質機能へ の影響	26
第3項 <i>in vivo</i> における抗 knob 抗体存在下の細胞間拡散治療用タンパク質を 用いたがんに対する遺伝子治療効果への影響	28
第4項 細胞膜上に存在する細胞間拡散タンパク質への抗 knob 抗体の結合 評価	30
第3節 考察	32

第2章 細胞間拡散キャリアタンパク質と標的細胞との相互作用による細胞機能への影響	35
第1節 キャリアタンパク質と標的細胞との相互作用による細胞機能への影響	36
第1項 組み換え knob タンパク質の作製及び結合評価	36
第2項 knob タンパク質の CAR との結合による細胞遊走能への影響	38
第3項 knob タンパク質の CAR を介した周辺細胞への拡散による細胞遊走能への影響	41
第2節 考察	44
【総括】	46
【実験の部】	48
【謝辞】	60
【参考文献】	61
【略語一覧】	65
【本論文内容の誌上発表】	67

【緒論】

2010年代後半から遺伝子治療は、新規治療法として欧米を中心として承認され、遺伝子治療の本格的な実用化が進み始めている^{1, 2, 3, 4)}。これは遺伝子導入方法の開発や改良によって、対象疾患が遺伝子疾患のみでなく、幅広い疾患に対して用いられるようになったことが挙げられ、遺伝子治療は今後さらなる発展が期待される^{5, 6, 7, 8)}。

現在、治療用遺伝子を搭載したベクターによる遺伝子治療が主に行われ、治療ストラテジーや標的細胞に応じて様々な遺伝子導入ベクターが開発されている^{4, 9)}。ベクターを用いた遺伝子治療の効果は標的細胞への遺伝子導入効率に左右されることが多く、最も遺伝子導入効率の高いウイルスベクターでさえ、全ての標的細胞へ遺伝子導入することは困難である。また、遺伝子治療に対する期待が一番高いのは抗がん治療であり、固形がんに対する遺伝子治療においては、特に遺伝子導入効率が治療効果に直結すると考えられている。そのため、現在行われている臨床試験の過半数はがんに対する遺伝子治療であるが^{7, 8)}、遺伝子導入細胞で治療用タンパク質が産生され、その細胞内での治療効果に限定される遺伝子治療 (Fig. 1A) では明確な有効性は得られていなかった。一方で、新しい遺伝子治療法としてがん細胞の表面抗原を認識するキメラ抗原受容体を細胞膜上に発現させた遺伝子改変 T 細胞を体外で作製し、体内へ戻す治療法が日本でも承認されたが、B 細胞性急性リンパ芽球性白血病に対しては治療効果を示すものの、固形がんに対しては有効性が乏しいことが報告されている^{10, 11, 12)}。

固形がんへの遺伝子治療戦略の1つとして、遺伝子導入細胞から治療用タンパク質を分泌させ、周辺細胞へ拡散させる報告がある^{13, 14, 15)} (Fig. 1B)。この戦略は遺伝子導入された細胞以外での効果が期待できるが、分泌タンパク質は体液を介して分泌拡散するため、がん組織以外への影響及び生体免疫系による捕捉や代謝による効果減弱が問題となる。また、分泌型タンパク質単独では細胞膜を透過しづらく、標的分子が細胞内に存在する場合には、十分な効果が期待できない。そのため、固形がんに対する治療効果と安全性の向上のためには、既存の技術では不十分であり、新しい治療戦略や技術が必要である。この問題点を克服するアプローチとして、治療用タンパク質の遺伝子に細胞膜透過性ペプチドとして知られているヒト免疫不全ウイルス (HIV) 由来の trans-acting activator of transcription (Tat) タンパク質¹⁶⁾の遺伝子と分泌シグナル配列を組み込み、遺伝子導入細胞から周辺細胞へ治療用タンパク質を拡散させる方法がある^{17, 18)} (Fig. 1C)。この方法は、治療用タンパク質の細胞内からの分泌拡散

と細胞内へのデリバリーを可能としているが、治療用タンパク質の拡散が体液を介したものであるため、分泌型タンパク質のみを利用した治療戦略と同様に、標的細胞以外への影響及び生体免疫系による捕捉や代謝による効果減弱という点で改善の余地がある。

したがって、遺伝子導入細胞内で産生された治療用タンパク質が体液を介さずに、さらに標的細胞へ拡散が可能となれば (Fig. 1D)、遺伝子治療が抱える遺伝子導入効率や安全性というハードルを越え、有用性を向上させることができると考えた。そこで本研究では、導入した遺伝子が産生した治療用タンパク質が、相互作用分子特異的に体液を介さずに標的細胞へ拡散可能な治療戦略を提案し、固形がんに対する遺伝子治療に応用可能な治療用タンパク質の細胞間拡散システムの構築やその可能性について *in vivo* 実験において検討した。

遺伝子導入細胞から治療用タンパク質を他の細胞に拡散するためには、キャリアが必要である。これまで薬剤学研究室では 5 型のアデノウイルス (Adv5) を用いた検討により、Adv5 粒子の各頂点に存在する fiber タンパク質とよばれる突起構造が、fiber 発現細胞の細胞表面に分布し、さらに、培養上清を介さずに周辺細胞へと拡散すること、その機能を担う領域は knob 領域であることを *in vitro* 実験にて明らかとしてきた¹⁹⁾。さらに、この拡散には coxsackievirus and adenovirus receptor (CAR) と knob が結合していることが必要である。したがって、Adv5 の knob タンパク質 (Adv5knob) 機能を利用することで、治療用タンパク質を相互作用分子特異的に遺伝子導入細胞から体液を介さずに標的細胞に拡散することが可能であると考えられる。そこで、本研究では Adv5knob を治療用タンパク質のキャリアとして利用し、検討することで、遺伝子治療に利用可能な新たな治療戦略の可能性を示し、その有用性について検証した。第 1 章では担がんマウスを用いた治療実験により、本研究の戦略における治療用タンパク質の相互作用分子特異的な拡散が、固形がんに対する遺伝子治療の効果増強に寄与するか検討した。第 2 章では、拡散性を有するキャリアタンパク質が周辺細胞へと拡散し、相互作用分子と結合することによる生体機能への影響について検討した。これらの検討から、Adv5knob を治療用タンパク質のキャリアとして用いることで、有意に腫瘍体積の増大を抑制し、その効果は Adv5knob の相互作用分子特異的な拡散に依存する結果が得られた。さらに、Adv5knob の拡散により生理機能にほとんど影響を及ぼさないことが示された。このことから、治療用タンパク質を遺伝子導入細胞から体液を介さずに標的細胞に相互作用分子特異的に拡散させる治療戦略は、固形がんに対する遺伝子治療の効果増強に寄与することが示唆され、本研究はこれまでの遺伝子治療

の有効性と安全性を向上させるようなキャリアの創製及び新規遺伝子治療戦略の構築につながるものであると考えられる。

本研究により得られた知見について、以下に記述する。

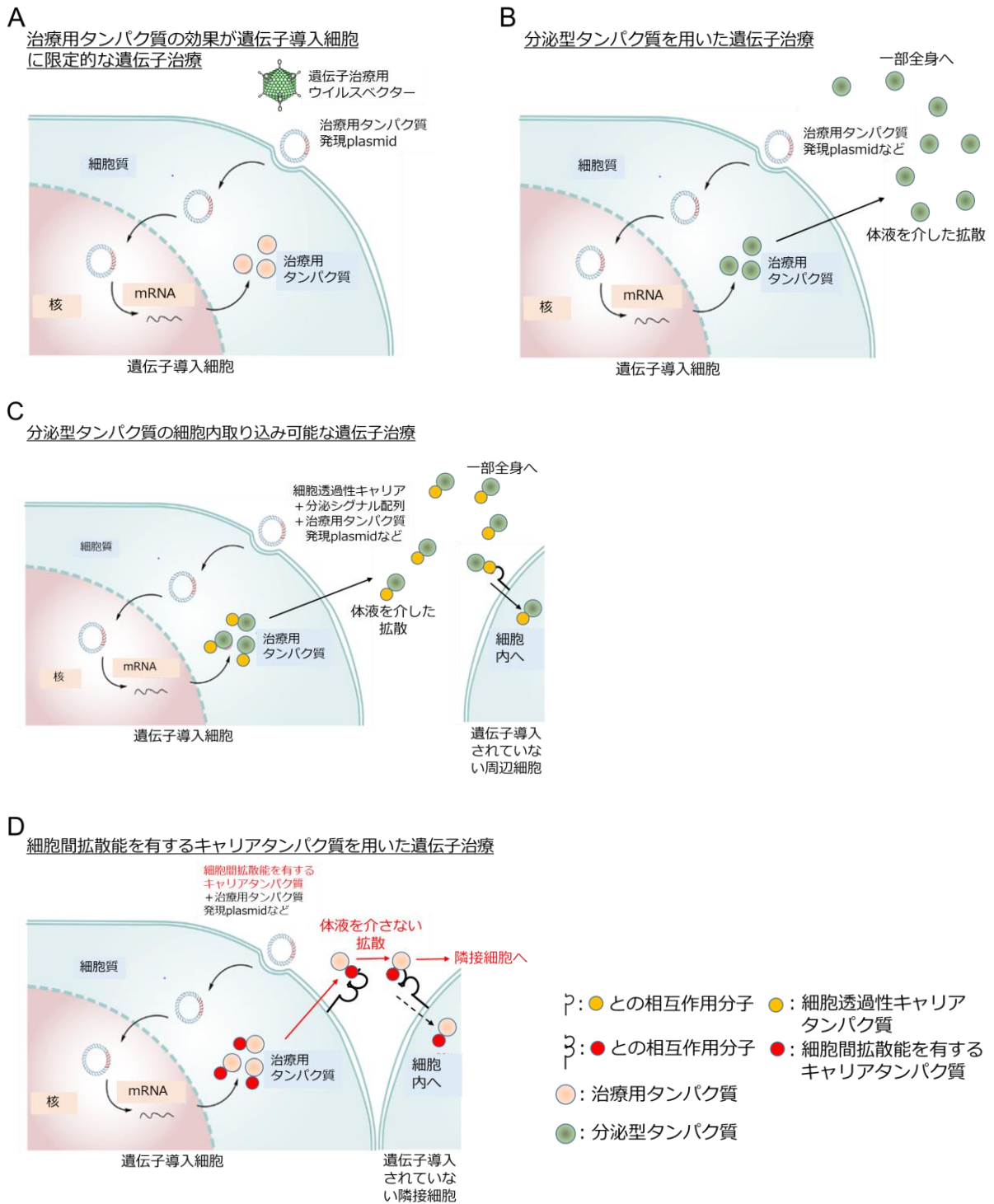


Fig. 1 本研究における治療戦略の概略図

- A. 治療用タンパク質の効果が遺伝子導入細胞に限定的な遺伝子治療（既存の多くの遺伝子治療）
- B. 分泌型タンパク質を用いた遺伝子治療
- C. 分泌型タンパク質の細胞内取り込み可能な遺伝子治療
- D. 細胞間拡散能を有するキャリアタンパク質を用いた遺伝子治療（本研究の治療戦略）
（参考文献 4 番の Fig. 2 を改変）

【本論】

第1章 治療用タンパク質の細胞間拡散が及ぼす遺伝子治療効果への影響

近年、遺伝子治療はパーキンソン病²⁰⁾、AADC (aromatic L-amino acid decarboxylase : 芳香族アミノ酸脱炭酸酵素) 欠損症²¹⁾、血友病²²⁾、脊髄性筋萎縮症²³⁾など、様々な疾患に対して臨床的有効性が示され、遺伝子治療に対する期待は大きくなっている。さらに、がんに対する臨床試験も数多く行われており、遺伝子導入ベクターの開発や遺伝子改変細胞を用いた新たな治療戦略により、ある程度の治療効果が得られている¹⁾。しかしながら、ベクター開発による遺伝子導入効率の向上には限界があることや、治療用タンパク質が、体液を介して拡散・デリバリーする治療戦略は、それぞれ克服すべき課題が多くある。そこで本研究ではこれらの問題を克服するために、遺伝子導入細胞で産生された治療用タンパク質が体液を介さずに標的細胞に拡散可能となるようなキャリアタンパク質を用い、これまでの遺伝子治療と相乗効果が得られる治療戦略を提案し、その有用性について評価を行った。

これまでの本研究室の検討により Adv5knob が発現細胞膜上に分布し、さらに周辺細胞へと拡散することを明らかにしてきた。また、周辺細胞への拡散は培養上清を介さずに相互作用分子である CAR 依存的に起こることを示してきた。したがって、治療用タンパク質を遺伝子導入細胞から体液を介さずに標的細胞に相互作用分子特異的に拡散・デリバリーさせる治療戦略の有用性を示すため、Adv5knob は利用可能であると考えた。そこで、第1章では Adv5knob を治療用タンパク質のキャリアとして利用した治療実験により、本研究の治療戦略が遺伝子治療へ応用可能であるか検討した。

第 1 節 治療用タンパク質の細胞間拡散による治療効果への影響

本節では、細胞増殖抑制効果を有するタンパク質と Adv5knob を融合し、キャリアタンパク質として Adv5knob の機能を利用することで、治療用タンパク質を遺伝子導入細胞から標的細胞へ効果的に拡散させることとした。さらに、本融合タンパク質を発現するプラスミドを用いて固形がんに対する遺伝子治療効果への影響を検討し、その有用性について検証した。治療用タンパク質のモデルとして、アポトーシスの誘導によるがん細胞の増殖抑制が報告されているコレラ毒素を用いた²⁴⁾。コレラ毒素は、コレラ菌が産生するタンパク質性の毒素であり、A サブユニット 1 分子と B サブユニット 5 分子から構成されている。A サブユニット (NCTXA) は、コレラ毒素の細胞増殖抑制機能を担う領域であり、三量体 GTP 結合タンパク質である Gs の α サブユニットを ADP-リボシル化する。これにより、アデニル酸シクラーゼが恒常的に活性化され、細胞内の cAMP 濃度が上昇することで細胞増殖抑制効果を引き起こす。また、NCTXA は細胞膜結合能を欠損しており、単独では遺伝子導入細胞からの放出や体液を介した細胞内への取り込みも起こらず、標的細胞への治療効果は示さない。よって、遺伝子導入細胞以外への NCTXA による治療効果は Adv5knob の拡散機能及び細胞内への取り込みに依存すると考え、NCTXA を治療用タンパク質のモデルとし、遺伝子工学的に Adv5knob と融合した NCTXA-Adv5knob を用いて検討した。本融合タンパク質は、タンパク質の検出のため、C 末端に FLAG-tag 配列を付与した (Fig. 2)。

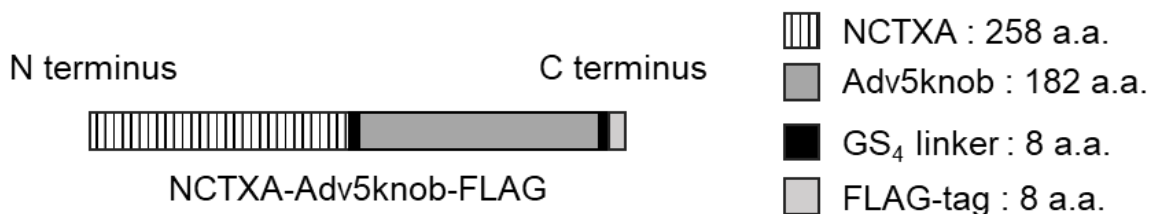


Fig. 2 NCTXA-Adv5knob-FLAG の模式図

第1項 コレラ毒素 A サブユニットを融合した細胞間拡散タンパク質の機能評価

タンパク質の機能には立体構造が重要であることから、NCTXA と Adv5knob を遺伝子工学的に融合することによって Adv5knob の機能が失われる可能性がある。そこで、*in vitro* 実験において NCTXA-Adv5knob の CAR との結合を介した細胞膜上への分布能、及び周辺細胞への拡散能について評価した。また、Adv5knob と CAR の結合能が及ぼす治療効果に対する評価を行うため、異なる機能を持った様々なタンパク質 (Table 1) も検討に用いた。Table 1 に示す NCTXA-Adv5knob Δ F(AB) は knob タンパク質の CAR との結合に重要な AB ループ²⁵⁾を欠損させ、CAR との結合能を欠損させたタンパク質である。各タンパク質の発現プラスミドを用い、遺伝子導入細胞膜上への分布及び周辺細胞への拡散に関する検討では、マウスを用いた *in vivo* 実験を想定し、CAR 陰性細胞であるマウスメラノーマ由来細胞株 (B16 細胞) 及びヒト CAR を発現させた B16 細胞 (hCAR-B16 細胞) を用いた (Fig. 3)。まず、NCTXA-Adv5knob の遺伝子をコードしたプラスミドを Lipofectamine[®]3000 Reagent により B16 細胞及び hCAR-B16 細胞に遺伝子導入し、各細胞の膜上に存在する NCTXA-Adv5knob をフローサイトメトリーにて検出した。その結果、B16 細胞においては、Adv5knob 及び NCTXA-Adv5knob 発現プラスミドのいずれを導入した場合においても、蛍光強度の上昇は見られなかった (Fig. 4A)。一方、hCAR-B16 細胞においては Adv5knob と同様に NCTXA-Adv5knob 発現プラスミドを導入した細胞で蛍光強度が増加した (Fig. 4B)。このことから、NCTXA-Adv5knob は Adv5knob と同様に CAR の発現に依存して、遺伝子導入細胞膜上への分布能を有することが示されたことから、次に遺伝子導入細胞から周辺細胞への拡散能についても検討した。NCTXA-Adv5knob の発現プラスミドを、リン酸カルシウム法により、CAR 陽性細胞である GFP 発現 293T 細胞 (293T-GFP 細胞) に遺伝子導入後、B16 細胞又は hCAR-B16 細胞と共培養し、各細胞膜上に存在する NCTXA-Adv5knob の存在量をフローサイトメトリーにて検出した。その結果、B16 細胞においては、Adv5knob 及び NCTXA-Adv5knob を示す蛍光強度の上昇は見られず (Fig. 5A)、一方で hCAR-B16 細胞においては、両タンパク質を示す蛍光強度の上昇がみられた (Fig. 5B)。このことから、NCTXA-Adv5knob は Adv5knob と同様に CAR の発現に依存した遺伝子導入細胞膜上への分布能及び、周辺細胞への拡散能を有することが示された。以上より、NCTXA-Adv5knob を用いることで、遺伝子導入細胞から標的細胞に治療用タンパク質を拡散させるという治療戦略の有用性を検証することが可能であることが示唆された。

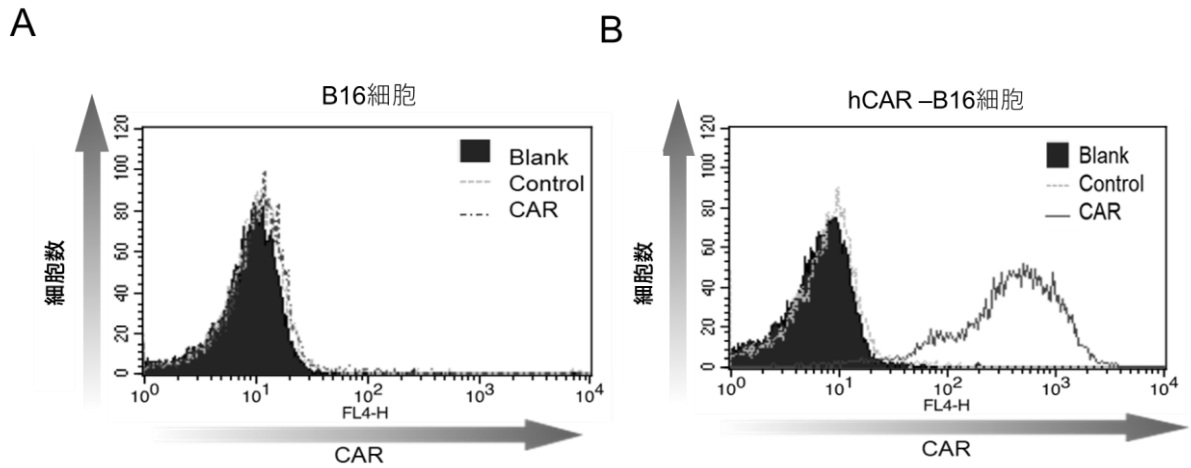


Fig. 3 B16 細胞表面及び hCAR-B16 細胞表面でのヒト CAR の発現

各細胞を播種し、約 16 時間培養した。その後、細胞を剥離し、抗 CAR 抗体または Control 抗体および APC 標識された 2 次抗体を用いて、フローサイトメトリーにて B16 細胞 (A)、または hCAR-B16 細胞 (B) の細胞膜上に発現しているヒト CAR を検出した。

Table 1 *in vitro* 及び *in vivo* 実験にて用いた各種タンパク質の機能

	細胞間拡散能	細胞増殖抑制機能
Adv5knob	+	-
NCTXA	-	+
NCTXA-Adv5knob Δ F(AB)	-	+
NCTXA-Adv5knob	+	+

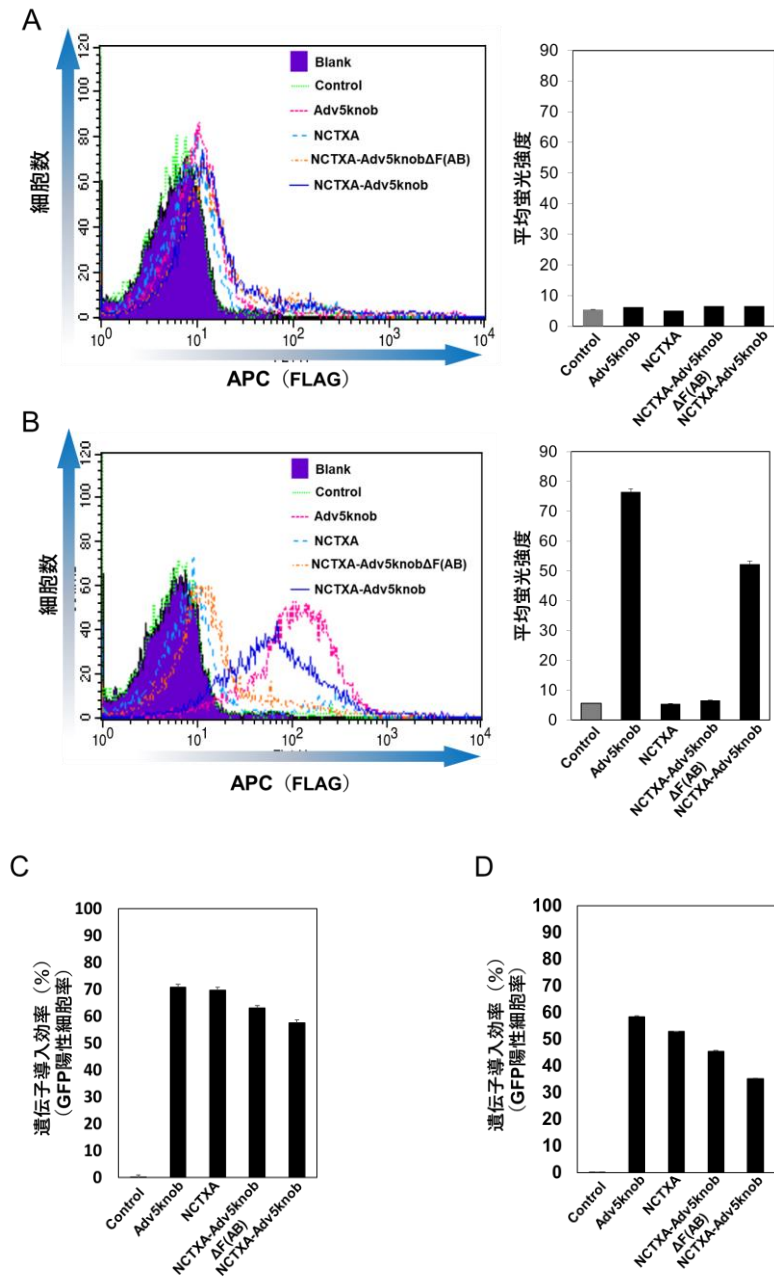


Fig. 4 NCTXA-Adv5knob の細胞膜上への分布

B16 細胞 (A)、または hCAR-B16 細胞 (B) に各種タンパク質発現プラスミドを導入し、約 16 時間培養した。その後、細胞を剥離し、抗 FLAG-tag 抗体および APC 標識された 2 次抗体を用いてフローサイトメトリーにて細胞膜上に分布している各種タンパク質を検出した。なお、(A)、(B) の右図は B16 細胞又は hCAR-B16 細胞膜上に存在する各種タンパク質由来の平均蛍光をフローサイトメトリーにて得た値である。さらに、B16 細胞 (C)、または hCAR-B16 細胞 (D) の各種タンパク質発現プラスミドの遺伝子導入効率は各プラスミドから発現される GFP の陽性率を指標とした。(平均 ± 標準偏差、n=3)

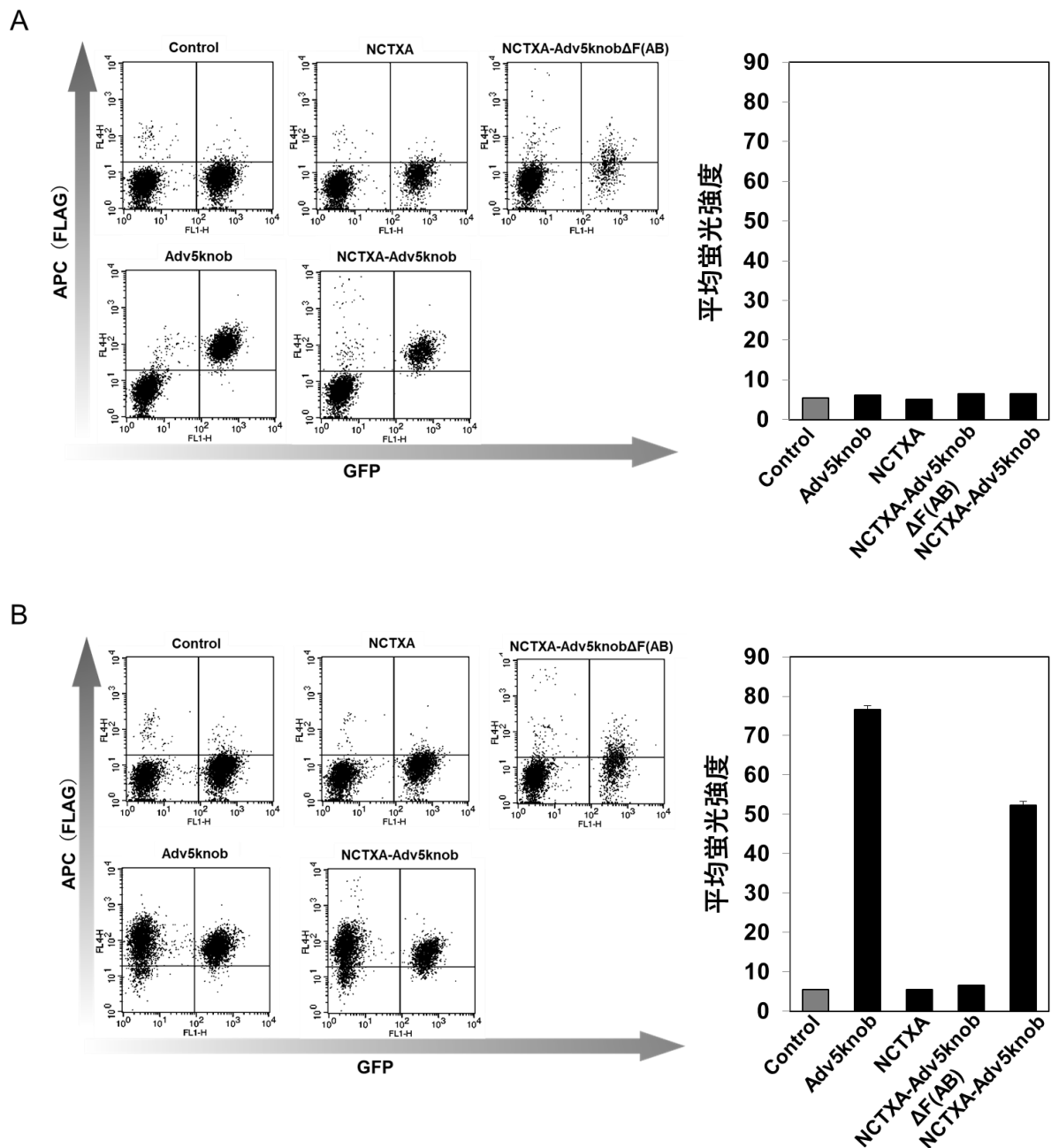


Fig. 5 NCTXA-Adv5knob の周辺細胞への拡散

293T-GFP 細胞に各種タンパク質発現プラスミドを導入し、約 16 時間培養した。その後、293T-GFP 細胞を剥離し、B16 細胞 (A)、または hCAR-B16 細胞 (B) と各 3×10^5 cells/well となるように 6 well plate に播種して、約 16 時間共培養した。その後、細胞を剥離し、抗 FLAG-tag 抗体および APC 標識された 2 次抗体を用いてフローサイトメトリーにて細胞膜上に存在する各種タンパク質を検出した。なお、(A)、(B) の右図は共培養した GFP 陰性細胞である B16 細胞又は hCAR-B16 細胞のみの細胞膜上に存在する各種タンパク質由来の平均蛍光強度をフローサイトメトリーにて得た値である。(平均 \pm 標準偏差、n=3)

第2項 担がんマウスにおける遺伝子導入細胞からの治療用タンパク質の細胞間拡散による治療効果

前項にて、治療用のモデルタンパク質として用いた NCTXA にキャリアタンパク質として Adv5knob を融合した NCTXA-Adv5knob が Adv5knob の相互作用分子である CAR への結合を介した細胞膜上への分布能、及び周辺細胞への拡散能を有することが明らかとなった。そこで、本項では NCTXA-Adv5knob を用いて、治療用タンパク質を遺伝子導入細胞から標的細胞に拡散させる治療戦略の有用性を評価するため、CAR 発現細胞を用いて担がんマウスを作製し、その治療効果を検討した。

はじめに、hCAR-B16 細胞を 1×10^6 cells/匹ずつ、C57BL/6 マウスの腹部皮下に移植し、担がんマウスを作製した。がんの長径が 7 mm 以上になった 8 日目に 1 回目、その後 10、12 日目に各種タンパク質を発現する hCAR-B16 細胞を腫瘍内に投与し、経時的に腫瘍径を測定した。また、投与した遺伝子導入 hCAR-B16 細胞における遺伝子導入効率は各プラスミドから発現される GFP の陽性率にて確認し (Fig. 6)、各種タンパク質の発現量は western blotting 法にて確認した (Fig. 7A)。各種発現プラスミドの遺伝子導入効率は 69~73 % となり、大きな違いはなく、遺伝子導入効率の違いによる治療効果への影響は少ないと考えられる (Fig. 7B)。担がんマウスの治療実験の結果、Adv5knob または NCTXA 単独発現細胞投与群、及び CAR との結合能を欠損させた NCTXA-Adv5knob Δ F(AB) 発現細胞投与群のいずれの群と比較しても、NCTXA-Adv5knob 発現細胞投与群は有意に腫瘍体積の増大を抑制していた (Fig. 8)。このことから、Adv5knob を用いた NCTXA の遺伝子導入細胞から周辺のがん細胞への拡散が、腫瘍体積の増大抑制効果に大きく寄与していることが示唆された。さらに、遺伝子導入効率の異なる NCTXA-Adv5knob① (遺伝子導入効率: 39 %) と NCTXA-Adv5knob② (遺伝子導入効率: 73%) 発現 hCAR-B16 細胞を担がんマウスの腫瘍内に投与することにより、治療効果と融合タンパク質の発現量依存性について検討した。その結果、治療用タンパク質の発現量が少ない NCTXA-Adv5knob①においても、NCTXA-Adv5knob②と同様に Control 群や NCTXA 群と比較して有意に腫瘍体積の増大を抑制していた (Fig. 9)。また、NCTXA-Adv5knob①と NCTXA-Adv5knob②の 23 日目における腫瘍体積に有意な差はなかったが、治療用タンパク質の発現量依存的に腫瘍体積の増大を抑制する傾向が示された。

次に、NCTXA-Adv5knob の遺伝子導入細胞からの拡散が相互作用分子特異的なものであることから、拡散を示さない CAR 陰性細胞を用いた治療効果の影響について検

討した。また、腫瘍内への NCTXA-Adv5knob 発現細胞投与より、2 日から 4 日間で腫瘍体積の増大抑制効果が得られるため、本検討では投与を 1 回とし、腫瘍体積の測定は 4 日間とした。その結果、CAR 陰性の B16 細胞を NCTXA-Adv5knob の供給細胞として用いた場合、腫瘍体積の増大は抑制されなかったことから (Fig. 10)、NCTXA-Adv5knob の腫瘍体積の増大抑制効果は CAR 発現に依存した Adv5knob の拡散能が関与していることが示唆された。

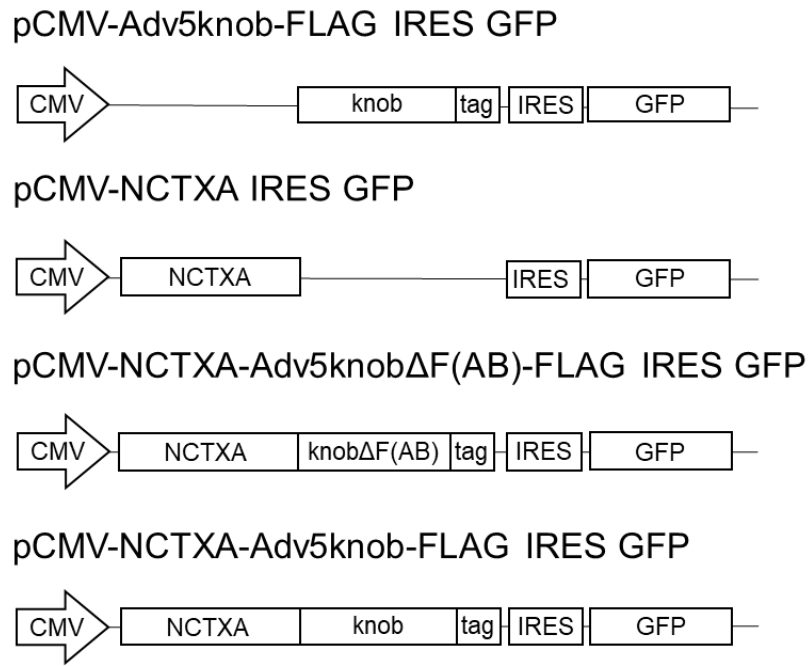


Fig. 6 *in vivo* 実験で用いた各種タンパク質発現プラスミドの模式図

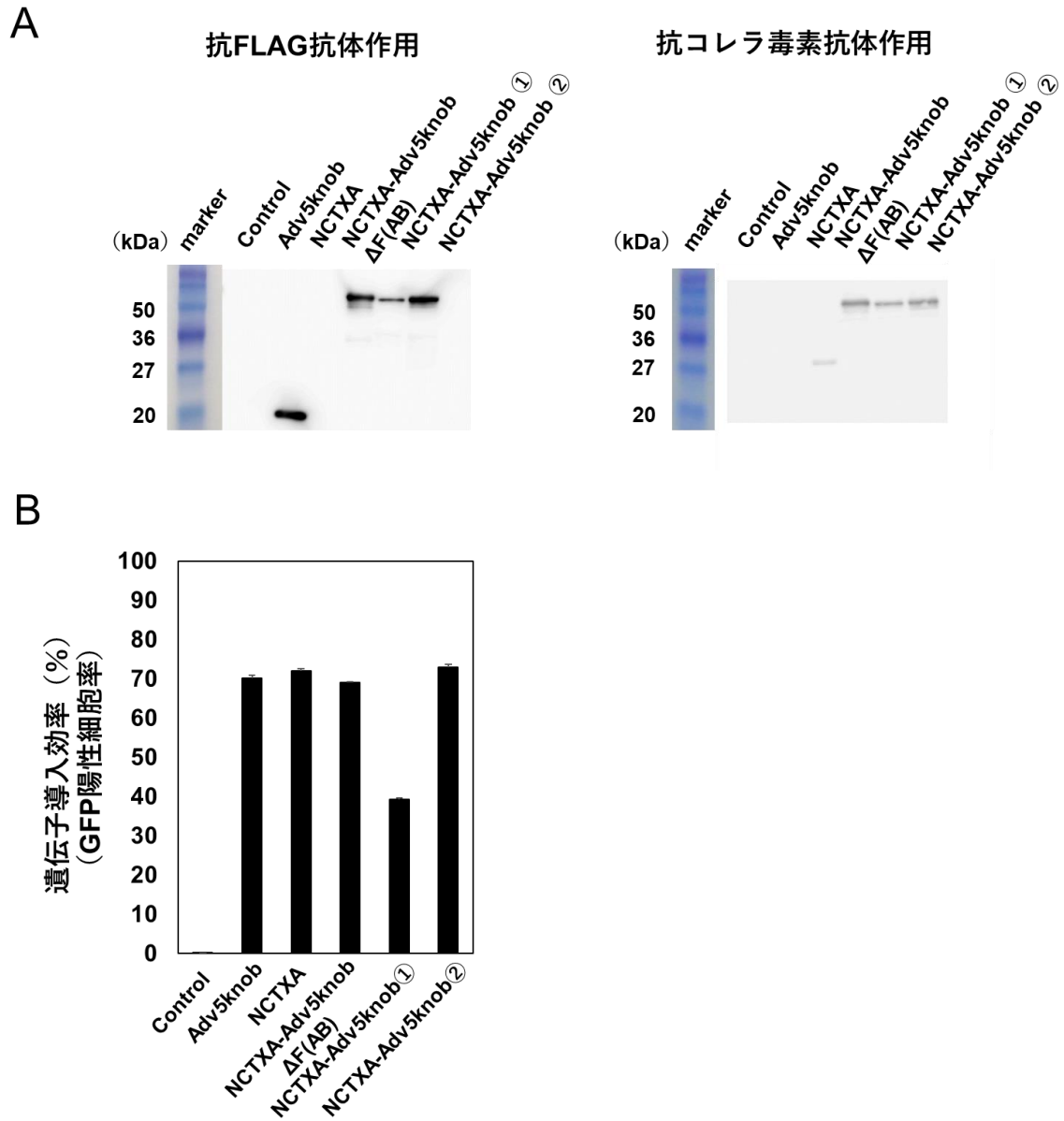


Fig. 7 腫瘍内投与細胞における各種タンパク質発現量及び遺伝子導入効率の確認

A. hCAR-B16 細胞に各種タンパク質発現プラスミドを導入し、約 16 時間培養した後に、western blotting 法のサンプルとした。各種タンパク質の発現は抗 FLAG-tag 抗体（左図）、抗コレラ毒素抗体（右図）及び HRP 標識された 2 次抗体を用いて検出した。

B. 各種タンパク質発現プラスミドを導入した hCAR-B16 細胞を約 16 時間培養後に回収し、フローサイトメトリーにて GFP 陽性細胞率を得た。その値を各種タンパク質を発現する腫瘍内投与細胞の遺伝子導入効率とした。

（平均 ± 標準偏差、n=3）

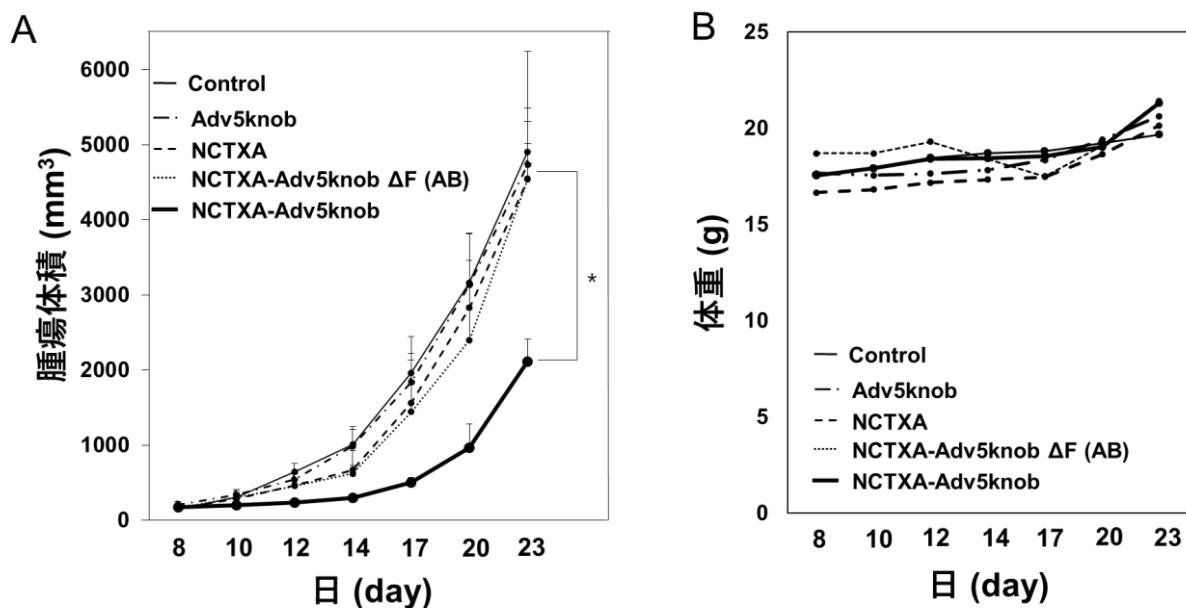


Fig. 8 担がんマウスにおける NCTXA-Adv5knob 発現細胞投与時の経時的な腫瘍体積変化
hCAR-B16 細胞を用いて担がんマウスを作製し、各種タンパク質発現 hCAR-B16 細胞を腫瘍内に投与した。腫瘍内投与はがん細胞移植より 8、10、12 日目の計 3 回行い、腫瘍体積 (A) 及び体重 (B) を 14 日目までは 2 日おきに、14 日目以降は 3 日おきに測定した。
(平均 ± 標準偏差、n=5、* $p < 0.05$ vs. Control、Adv5knob、NCTXA、NCTXA-Adv5knob Δ F(AB)発現細胞投与群)

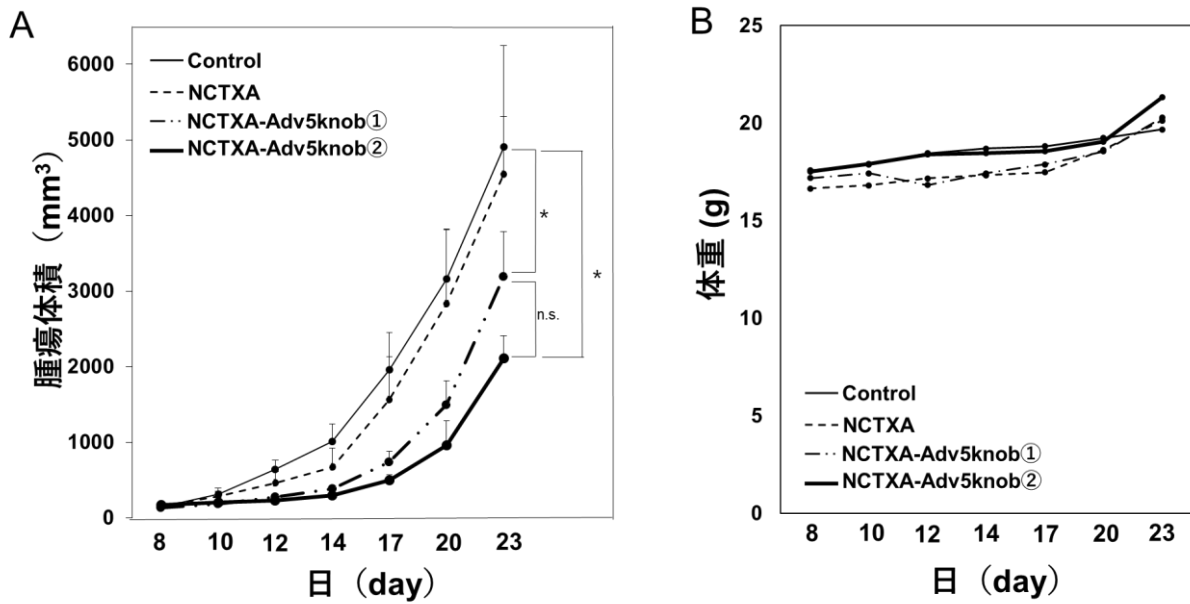


Fig. 9 担がんマウスにおける NCTXA-Adv5knob 発現細胞投与量の違いによる経時的な腫瘍体積変化

hCAR-B16 細胞を用いて担がんマウスを作製し、NCTXA-Adv5knob の発現量が少ない（遺伝子導入効率：39 %）NCTXA-Adv5knob①発現細胞と発現量の多い（遺伝子導入効率：73 %）NCTXA-Adv5knob②発現細胞を腫瘍内に投与した。腫瘍内投与はがん細胞移植より 8、10、12 日目の計 3 回行い、腫瘍体積（A）及び体重（B）を 14 日目までは 2 日おきに、14 日目以降は 3 日おきに測定した。

（平均 ± 標準偏差、n=5、* $p < 0.05$ vs. Control、NCTXA 発現細胞投与群、n.s.: not significant）

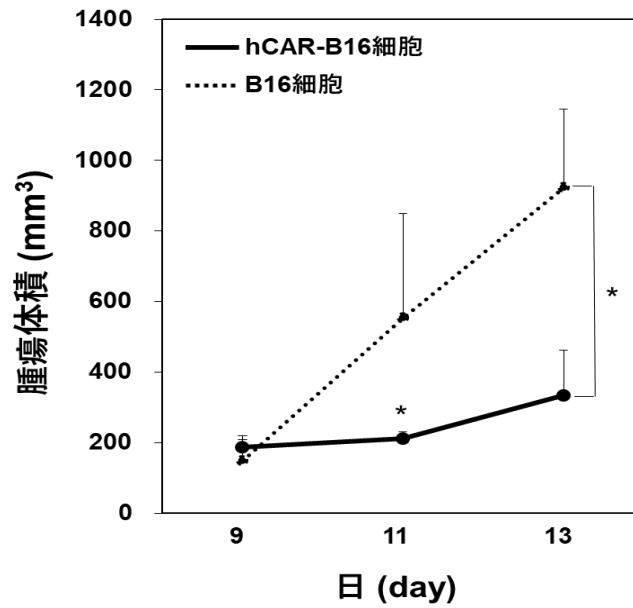


Fig. 10 NCTXA-Adv5knob 発現細胞の CAR の有無による担がんマウスの治療効果

hCAR-B16 細胞を用いて担がんマウスを作製し、CAR 発現量の異なる NCTXA-Adv5knob 発現 hCAR-B16 細胞と NCTXA-Adv5knob 発現 B16 細胞を腫瘍内に投与した。腫瘍内投与はがん移植 9 日目に 1 回行い、腫瘍径の測定を 2 日おきに行った。

(平均 ± 標準偏差、n=3、 * $p < 0.05$ vs. NCTXA-Adv5knob 発現 B16 細胞)

第3項 免疫組織染色による腫瘍組織内の観察

本項では、腫瘍内に NCTXA-Adv5knob 発現細胞を投与した際の組織学的変化について免疫組織染色にて評価した。マウスに作製した hCAR-B16 細胞由来の腫瘍内に NCTXA-Adv5knob 発現 hCAR-B16 細胞を投与し、2 日後に腫瘍を摘出し、HE 染色及び活性化 Caspase-3 染色を行った。HE 染色は細胞質をエオジンで、細胞核をヘマトキシリンで染色し、組織構造の全体像を把握するために行った。また、コレラ毒素がアポトーシスを誘導するという報告があるため²⁴⁾、アポトーシスの実行過程における中心的酵素である活性化 Caspase-3 を検出し、組織内でのアポトーシス誘導を観察した。比較として、遺伝子導入を行っていない hCAR-B16 細胞及び遺伝子導入細胞からの拡散能のない NCTXA-Adv5knob Δ F(AB)を発現させた hCAR-B16 細胞を投与した腫瘍組織を用いた。その結果、NCTXA-Adv5knob 発現 hCAR-B16 細胞投与において、核の濃染や形態が崩れた細胞が多くみられた (Fig. 11A)。さらに、活性化 Caspase-3 陽性細胞が NCTXA-Adv5knob 発現 hCAR-B16 細胞投与において多く観察され、アポトーシスの誘導されている細胞が観察された (Fig. 11B)。よって、NCTXA と Adv5knob を遺伝子工学的に融合させた場合においても、コレラ毒素の細胞傷害能が保持され、細胞死を誘導していることが示された。さらに、NCTXA-Adv5knob を発現させた細胞を投与した腫瘍組織では、拡散能を持たない NCTXA-Adv5knob Δ F(AB)と比較して、より多くの細胞にて細胞死が誘導されていることから、Adv5knob の有する拡散能が遺伝子導入されていない周辺のがん細胞へも NCTXA を供給し、アポトーシスを誘導していることが示唆された。

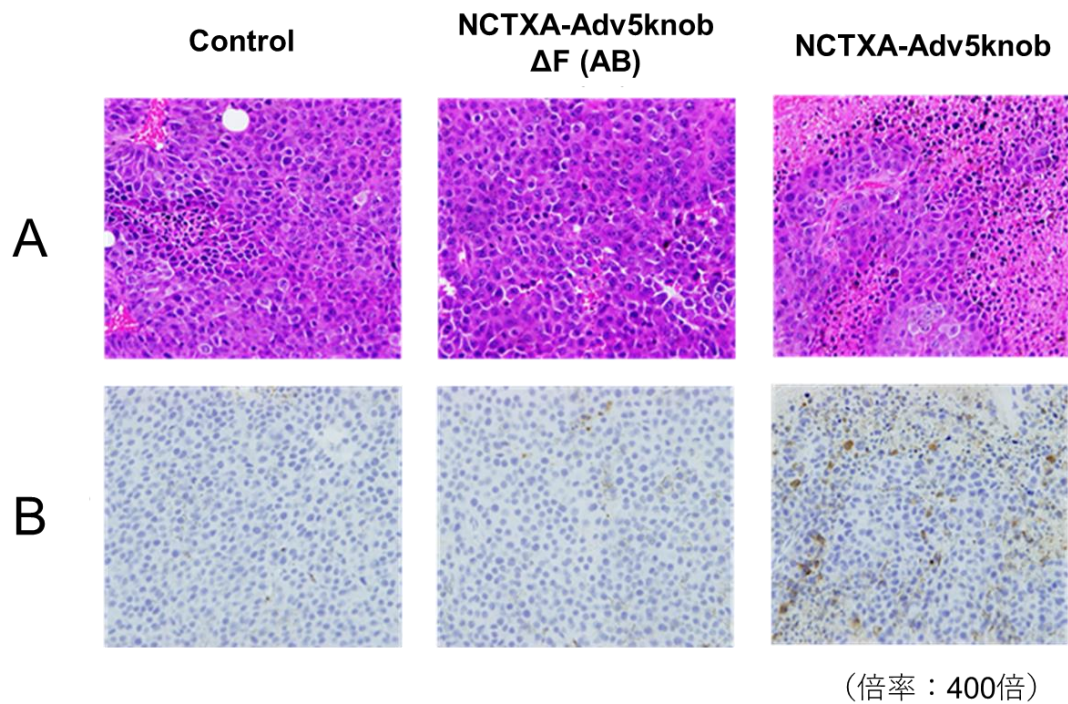


Fig. 11 組織染色による担がんマウス腫瘍内の観察

hCAR-B16 細胞を用いて担がんマウスを作製し、各種タンパク質発現 hCAR-B16 細胞を腫瘍内に投与した。Control にはタンパク質発現プラスミドを導入していない hCAR-B16 細胞を投与した。2 日後に腫瘍を摘出して、以下の組織染色を行った。

A. HE 染色

B. 活性化 Caspase-3 染色

第4項 担がんマウスにおける治療用タンパク質発現プラスミド投与による治療効果

前項までは、治療用タンパク質をコードする遺伝子を導入した細胞を腫瘍内に投与することにより治療効果を評価してきた。本項ではベクターの *in vivo* 直接投与による遺伝子治療の効果について検討するため、NCTXA-Adv5knob 発現プラスミドと遺伝子導入試薬との複合体を腫瘍内に投与し治療効果を評価した。この検討では、がん細胞の CAR 発現が及ぼす、治療効果への影響を評価するため、CAR 発現量の異なる B16 細胞または hCAR-B16 細胞を用いて、担がんマウスを作製した。その結果、ヒト CAR 陰性の B16 細胞を用いた担がんマウスにおいて、NCTXA-Adv5knob 発現プラスミド投与群では、Adv5knob または NCTXA の単独発現プラスミド投与群と同様に腫瘍体積の増大は抑制されなかった (Fig. 12)。一方で、hCAR-B16 細胞を用いた担がんマウスにおいては、Adv5knob 又は NCTXA の単独発現プラスミド投与群に比べ、NCTXA-Adv5knob 発現プラスミド投与群では、腫瘍体積の増大は有意に抑制された (Fig. 13)。このことから、腫瘍内に治療用プラスミドベクターを直接投与する *in vivo* 治療実験においても、NCTXA-Adv5knob の抗腫瘍効果は認められ、その治療効果は CAR 発現に依存した Adv5knob の拡散能により増強されることが示唆された。

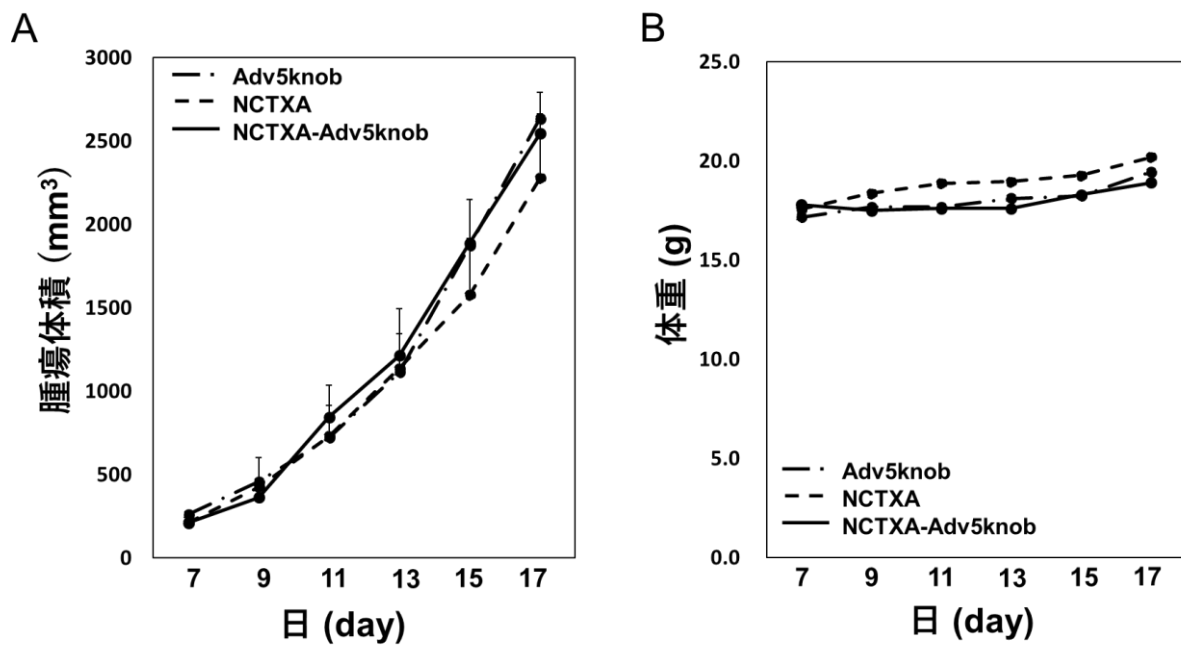


Fig. 12 担がんマウスの腫瘍内への発現プラスミド直接投与による腫瘍体積変化

B16細胞を用いて担がんマウスを作製し、各種タンパク質発現プラスミドと遺伝子導入試薬を腫瘍内に投与した。腫瘍内投与は担がんから7、11日目の計2回行い、腫瘍体積（A）及び体重（B）を2日おきに測定した。

（平均 ± 標準偏差、n=3）

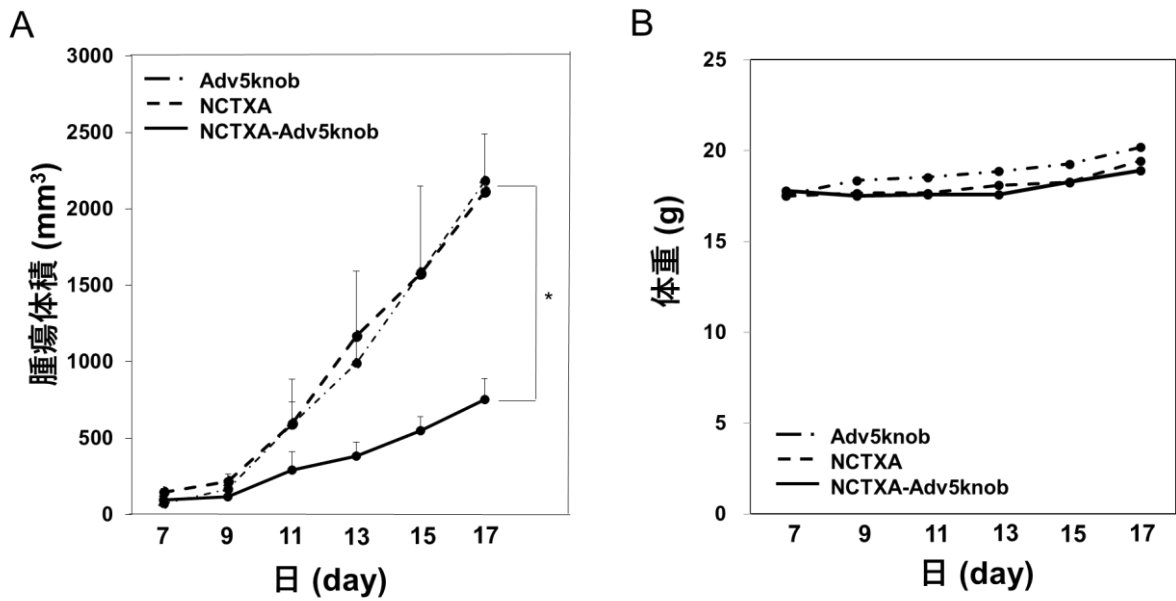


Fig. 13 担がんマウスの腫瘍内への発現プラスミド直接投与による腫瘍体積変化

hCAR-B16 細胞を用いて担がんマウスを作製し、各種タンパク質発現プラスミドと遺伝子導入試薬を腫瘍内に投与した。腫瘍内投与は担がんから 7、11 日目の計 2 回行い、腫瘍体積 (A) 及び体重 (B) を 2 日おきに測定した。

(平均 ± 標準偏差、n=3、* $p < 0.05$ vs. Adv5knob、NCTXA)

第2節 抗 knob 抗体による細胞間拡散タンパク質機能への影響

前節において、治療用タンパク質を遺伝子導入細胞から相互作用分子特異的に標的細胞へ拡散することが可能なキャリアタンパク質を用いることで、治療用タンパク質の細胞間拡散が、固形がんに対する遺伝子治療の効果増強に寄与することが示唆された。しかしながら、タンパク質医薬品は低分子医薬品と比べると、免疫原性が高く、異物と見なされることで生体免疫による排除を受け、治療効果の減弱が起こることが報告されている²⁶⁾。したがって、治療用タンパク質のキャリアとしてタンパク質を利用した本研究の治療戦略においても、タンパク質医薬品と同様に、生体免疫による影響を受ける可能性が考えられる。実際、本検討でキャリアタンパク質として利用した Adv5knob は Adv5 由来のタンパク質であり、マウス生体内で発現させることで抗 knob 抗体が産生されることが報告されているため²⁷⁾、抗 knob 抗体によるキャリアタンパク質としての機能低下が懸念される。また、本研究の治療戦略における治療用タンパク質の供給方法は、分泌型タンパク質の体液を介した拡散方法とは異なると考えられるが、細胞膜上にキャリアタンパク質が存在することからも、抗 knob 抗体の Adv5knob 拡散機能への影響が懸念される。そのため、本節では組換え knob タンパク質を複数回投与することで Adv5knob に対する抗体保有マウスを作製し、抗 knob 抗体存在下における NCTXA-Adv5knob の機能について評価した。

第1項 組換え knob タンパク質投与マウスにおける抗 knob 抗体産生の確認

はじめに、Adv5knob に対する抗体存在下におけるキャリアタンパク質の機能を検討するため、抗 knob 抗体を保有するマウスを作製した。リポポリサッカライド (LPS) を 5 µg/body で腹腔内投与した C57BL/6 マウスに、大腸菌組換えタンパク質作製技術を用いて、His-tag を付与した Adv5knob を作製し、20 µg/body で背部皮下投与した。また、Adv5knob 免疫マウス群の比較として、免疫の惹起による非特異的な抗腫瘍効果への影響を評価するために卵白アルブミン由来の ovalbumin (OVA) を投与した OVA 免疫マウスを作製した。OVA 免疫マウス群は Adv5knob 免疫マウス群と同様に LPS を 5 µg/body で腹腔内投与した C57BL/6 マウスに、OVA を 20 µg/body で背部皮下投与した。また、各種抗原は 5 日間隔で 4 回投与し、4 回目の投与から 3 日後に眼底採血を行い、各種マウス血清を得た。得られたマウス血清を用いて、マウス生体内における抗 knob 抗体の産生を ELISA 法にて確認した。

まず、マウス生体内における抗 knob 抗体の存在を確認するため、組換え Adv5knob-FLAG タンパク質をプレートに固相化し、マウス血清を 100 倍希釈で作用させ、マウス血清中の抗 knob 抗体を検出した。その結果、Adv5knob 免疫マウス血清作用群において、吸光度が上昇し (Fig. 14A)、血清中の抗 knob 抗体の存在が確認できたことから、抗 knob 抗体保有マウスが作製できたと考えられる。また、ELISA 法の結果より、吸光度上昇が高い血清を保有するマウスを Adv5knob 免疫 (high)、吸光度の上昇が低い血清を保有するマウスを Adv5knob 免疫 (low) とした。コントロールとして作製した OVA 投与マウスでは、OVA 免疫マウス血清作用群でのみ抗 OVA IgG の吸光度の上昇がみられ (Fig. 14B)、OVA 免疫マウスが作製できた。

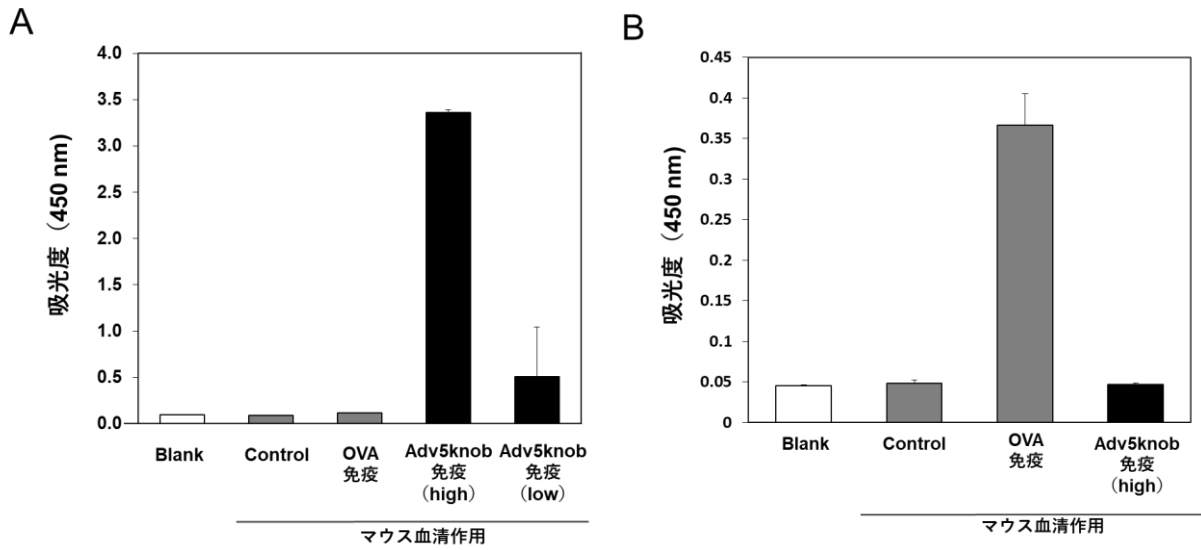


Fig. 14 組換え Adv5knob または OVA 投与マウス血清を用いた各種抗体量の確認

A. Adv5knob-FLAG を ELISA プレートに固相化し、マウス血清を 100 倍希釈で作用させた。HRP 標識された 2 次抗体を用いて抗 knob 抗体を ELISA 法にて検出した。Control はタンパク質を投与していないマウスの血清、OVA 免疫は OVA を抗原として投与したマウスの血清をそれぞれ作用させた。

B. OVA 特異的 IgG を測定可能な ELISA キットを使用し、各種マウス血清を作用させ、血清中の抗 OVA 抗体を検出した。

(平均 ± 標準偏差、n=3)

第2項 *in vitro* における抗 knob 抗体存在下の細胞間拡散タンパク質機能への影響

前項にて、組換え Adv5knob を投与することでマウス血清中に抗 knob 抗体が作製できたことから、血清中の抗 knob 抗体による Adv5knob の拡散能への影響について *in vitro* にて検討した。FLAG-tag を付与した Adv5knob 発現プラスミドを、リン酸カルシウム法により 293T 細胞に遺伝子導入後、100 倍希釈した各種マウス血清存在下において 293T-GFP 細胞と共培養し、遺伝子導入されていない 293T-GFP 細胞の細胞膜上における Adv5knob の存在量をフローサイトメトリーにて測定した。その結果、血清の有無や抗 knob 抗体の存在に関わらず、293T-GFP 細胞において同程度の上側へのシフトがみられ、蛍光強度の値にも有意な差はなかった (Fig. 15)。このことから、*in vitro* 実験においては、抗 knob 抗体が存在する場合においても Adv5knob の周辺細胞への拡散能は影響を受けないことが示唆された。

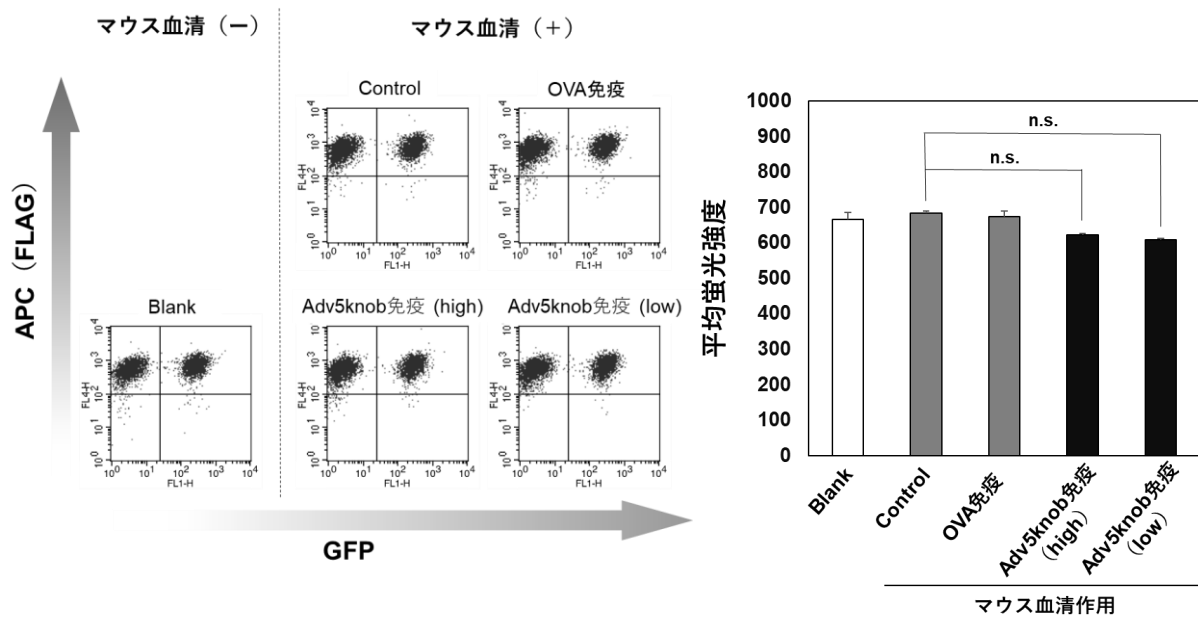


Fig. 15 *in vitro* における抗 knob 抗体存在下での knob タンパク質の周辺細胞への拡散

293T 細胞に Adv5knob-FLAG 発現プラスミドを導入し、約 16 時間培養した。その後、Adv5knob-FLAG 発現 293T 細胞を 293T-GFP 細胞と各 2.5×10^5 cells/well でマウス血清 (100 倍希釈) を含む培養液 2 mL で懸濁し、6 well plate にて 1 日培養した。その後、細胞を剥離し、抗 FLAG-tag 抗体および APC 標識された 2 次抗体を用いてフローサイトメトリーにて 293T-GFP 細胞膜上に存在する Adv5knob-FLAG を検出した。なお、右図は 293T-GFP 細胞のみの細胞膜上に存在する Adv5knob-FLAG 由来の平均蛍光強度をフローサイトメトリーにて得た値である。

(平均 \pm 標準偏差、n=3、n.s.: not significant)

第3項 *in vivo* における抗 knob 抗体存在下の細胞間拡散治療用タンパク質を用いたがんに対する遺伝子治療効果への影響

In vitro 実験では、抗 knob 抗体存在下においても、Adv5knob の周辺細胞への拡散能には影響は受けないという結果を得た。しかしながら、*in vitro* の検討においては、抗 knob 抗体量や周辺細胞への拡散後に Adv5knob が細胞内に取り込まれる過程までの検討はできない。そこで、*in vivo* にて細胞内に取り込まれることによって効果を発揮する NCTXA-Adv5knob の治療効果を指標に、抗 knob 抗体の Adv5knob 拡散能への影響について抗 knob 抗体保有マウスを用いて検討した。hCAR-B16 細胞を 1×10^6 cells/匹で、抗原投与した C57BL/6 マウスの腹部皮下に移植し、担がんマウスを作製した。腫瘍の長径が約 7 mm となった 8 日目に、NCTXA-Adv5knob 発現プラスミドを導入した hCAR-B16 細胞を腫瘍内に投与し、経時的に腫瘍径を測定した。その結果、すべての免疫惹起マウス群において、NCTXA-Adv5knob 発現細胞投与群のみで、Control 群および Adv5knob 発現細胞投与群と比較して、腫瘍体積の増大抑制傾向がみられた (Fig. 16A、B、C)。また、抗 knob 抗体量が異なる担がんマウスを用いたがん遺伝子治療実験においても、NCTXA-Adv5knob の抗腫瘍効果に差はなかった (Fig. 16C)。したがって、*in vivo* 実験においても Adv5knob のキャリア機能は、抗 knob 抗体量に関わらず保持され、治療用タンパク質の拡散による標的細胞への供給には影響が少ないことが示唆された。

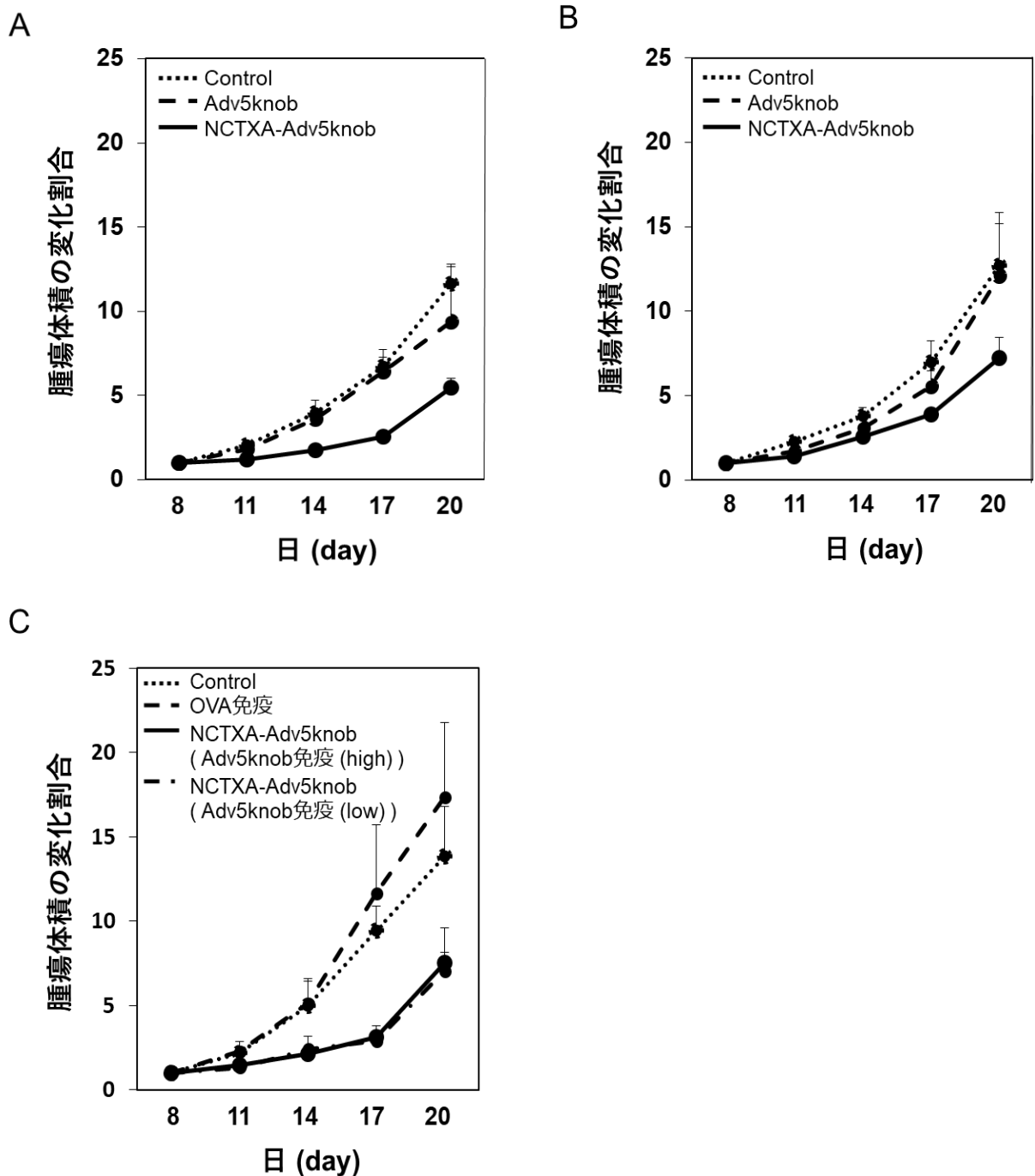


Fig. 16 各種免疫マウス腫瘍内への NCTXA-Adv5knob 発現細胞投与による腫瘍体積変化

抗原を免疫したマウスに hCAR-B16 細胞を移植し、8 日後に各種タンパク質発現 hCAR-B16 細胞を腫瘍内に投与した。腫瘍体積の測定は 3 日おきに行い、グラフは 8 日目の腫瘍体積からの変化割合を表している。

A. Control マウス群 (抗原の前投与なし)

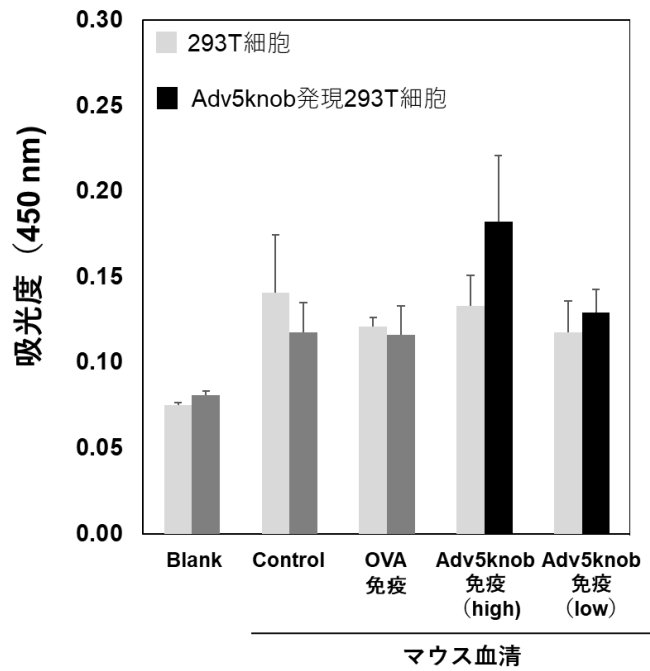
B. OVA 免疫マウス群

C. Adv5knob 免疫マウス群

第4項 細胞膜上に存在する細胞間拡散タンパク質への抗 knob 抗体の結合評価

前項までの検討において、抗 knob 抗体存在下において、Adv5knob の周辺細胞への拡散能は抗 knob 抗体による影響を受けにくく、Adv5knob の機能を利用した治療用タンパク質の拡散による標的細胞への供給には影響が少ないことが示唆された。治療用タンパク質のキャリアとして利用した Adv5knob は、遺伝子導入細胞から体液を介さずに相互作用分子である CAR と結合して拡散すると考えられているため、分泌タンパク質とは異なり、抗キャリア抗体の捕捉を受けにくい可能性が考えられる。そこで、得られた抗 knob 抗体含有マウス血清を用いて、細胞膜上に存在する Adv5knob と抗 knob 抗体の結合を Cell ELISA 法にて検討した。Adv5knob-FLAG 発現プラスミドを導入した 293T 細胞を固定化し、各種血清を 1000 倍希釈で作用させ抗 knob 抗体の結合を測定した。その結果、Adv5knob-FLAG を抗原とした ELISA の結果 (Fig. 14) と異なり、吸光度の有意な上昇がみられず (Fig. 17)、細胞膜上の Adv5knob に対して、抗 knob 抗体はあまり結合しないことが示唆された。Adv5knob はホモ三量体構造をしており、モノマーごとに CAR の D1 ドメインが結合し、2 組のモノマー同士の結合により複合体を形成することで Adv5knob と CAR の結合は成立する^{28, 25, 29, 30, 31})。同じウイルスタンパク質である、HIV エンベロープ糖タンパク質の gp120 と gp41 はヘテロダイマーを形成しており、ケモカインレセプターと結合した際に、gp120 の V3 領域への抗体結合が立体的に制限されることが報告されている^{32, 33})。したがって、CAR と Adv5knob の結合による複合体形成が、抗 knob 抗体の結合領域への接近を妨げている可能性が考えられる。詳細な検討は必要であるが、Adv5knob のキャリア機能においては、抗 knob 抗体による影響が小さくなっていることが示唆された。

A



B

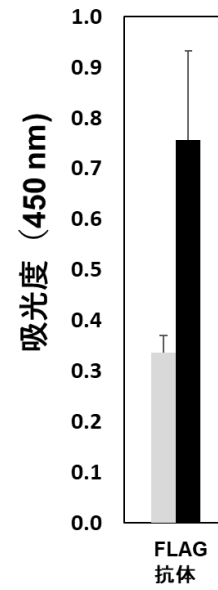


Fig. 17 細胞膜上に分布する Adv5knob に対する抗 knob 抗体の結合

A. Adv5knob-FLAG 発現プラスミドを導入した 293T 細胞を 96 well plate に 4×10^4 cells/well となるように播種した。翌日、細胞を固定化し、各種マウス血清を 1000 倍希釈で作用させた。HRP 標識された 2 次抗体を用いて細胞膜上に存在する Adv5knob-FLAG に結合した抗 knob 抗体を Cell ELISA 法にて検出した。

B. ポジティブコントロールとして Adv5knob 発現 293T 細胞膜上に存在する Adv5knob-FLAG を抗 FLAG-tag 抗体および HRP 標識された 2 次抗体で検出した。

第3節 考察

遺伝子治療の抱える様々な課題を克服し、既存の技術と共に相乗効果的に治療効果を増強できるような治療戦略が遺伝子治療のさらなる発展につながる。その1つとして、遺伝子導入された細胞以外にも治療効果を発揮させることが可能な戦略が考えられる。そこで、治療用タンパク質（本研究では NCTXA をモデルとした）を遺伝子導入細胞から体液を介さずに標的細胞に拡散するという治療戦略を考え、その有用性を担がんマウスを用いた遺伝子治療実験により検討した。治療実験には体液を介さずに細胞膜に分布し、CAR と結合することで周辺細胞へと拡散する機能を有する Adv5knob をキャリアタンパク質として利用した。治療用タンパク質を発現した遺伝子導入細胞、又は治療用タンパク質発現プラスミドを直接腫瘍内に投与し治療効果を評価した。その結果、どちらの方法においても NCTXA-Adv5knob は、拡散機能を持たない NCTXA 単独発現に比べ、腫瘍体積の増大を抑制し、反復投与により有意に腫瘍体積の増大が抑制された (Fig. 8、9、13)。本結果は、遺伝子導入されていない細胞にも Adv5knob の拡散能により治療用タンパク質が供給され、がん細胞内へ治療用タンパク質が取り込まれた効果であると考えられる。また、NCTXA-Adv5knob 発現量と治療効果には量依存的な傾向が見られた (Fig. 9)。さらに、相互作用分子である CAR の陰性細胞を用いて、NCTXA-Adv5knob の拡散能を低下させることで、NCTXA-Adv5knob による抗腫瘍効果は得られなかった (Fig. 10、12)。これらのことから、遺伝子治療に拡散能を有するキャリアタンパク質を用いることで、治療用タンパク質の遺伝子導入細胞以外への拡散や細胞内への供給が可能となり、遺伝子導入効率に左右されない遺伝子治療戦略が構築可能であることが示唆された。さらに、遺伝子導入細胞内からの CAR 特異的な細胞膜上への分布及び遺伝子導入細胞膜上から周辺細胞への CAR 特異的な拡散が治療効果に大きく寄与していることが示されたことから、本研究の治療戦略は相互作用分子特異的な治療用タンパク質の供給制御や標的化が可能な遺伝子治療戦略の構築も可能であることが示唆された。

遺伝子治療において最も汎用されているウイルスベクターでは、抗原性の低いことが知られているアデノ随伴ウイルス (AAV) ベクターでさえも大量投与や長期投与により、正常細胞への影響や生体免疫の活性化による副作用が懸念されていることから^{34, 35, 36, 37}、限られた投与量で最大限の効果を発揮するような治療戦略が望まれる。また、遺伝子治療において最も汎用されている Adv ベクターの遺伝子導入効率を向上させる試みとして、Adv ベクターのカプシドタンパク質にポリリジン (K7) や RGD

(Arg-Gly-Asp) モチーフをリガンドとして付与した改変型 Adv ベクターが作製されており、遺伝子発現量の増加や種々の細胞への遺伝子導入が可能となっている^{38, 39)}。しかしながら、すべての標的細胞に対して遺伝子導入することは困難であり、その打開策として、遺伝子導入細胞から治療用タンパク質を分泌させる方法が取られているが、体液を介した拡散により、標的細胞以外への影響及び生体免疫系による捕捉や代謝による効果減弱が懸念される^{18, 40, 41)}。したがって、体液を介さずに分子特異的な拡散能を有するキャリアタンパク質を用いた遺伝子治療戦略は遺伝子治療の問題点を克服し、既存の技術と相乗的に治療効果を高められるような治療戦略であると考えられる。

治療用タンパク質のキャリアがタンパク質である場合、抗体産生の影響について検討する必要がある。Adv5knob は分泌型タンパク質とは拡散方法は異なるものの、標的細胞に拡散するキャリアタンパク質は生体内の免疫系による捕捉を受け、キャリア機能が減弱し、治療効果が得られない可能性が考えられる。さらに、キャリアタンパク質がウイルス由来の場合はすでに抗体を保持していることも考えられ、キャリア機能への影響が懸念される。そこで、キャリアタンパク質に対する抗体存在下におけるキャリア機能への影響を検討した。キャリアタンパク質として利用した Adv5knob を免疫したマウス血清またはマウスを用いて *in vitro* 及び *in vivo* 実験において検討した。その結果、抗 knob 抗体は細胞膜上に存在する Adv5knob に対する結合が低く、Adv5knob に対する抗体が存在する場合においても、周辺細胞への拡散能に影響は与えなかった (Fig. 15)。さらに、担がんマウスを用いた治療効果にも、Adv5knob に対する抗体の有無は治療効果に大きな影響を示さなかった (Fig. 16)。また、抗 knob 抗体は、Adv5knob 単独では強く結合した一方、細胞膜上の Adv5knob へは、結合しにくい結果となった (Fig. 14、17)。周辺細胞への Adv5knob の拡散機構についてはさらなる検討が必要であるが、両検討の大きな違いは Adv5knob の CAR との結合の有無であるため、細胞膜上に存在する Adv5knob と CAR との結合の際に形成される複合体に対して、抗 knob 抗体が立体構造的に Adv5knob の抗体結合領域に接近しにくくなった可能性が考えられる。その結果として Adv5knob の標的細胞への拡散及び取り込みは抗体の存在による影響を受けにくく、抗 knob 抗体存在下においても治療効果が得られたと考えられる。これらのことから、細胞膜上の相互作用分子との結合を介して周辺細胞へと拡散するキャリア分子は、抗キャリア抗体によって機能を阻害されない可能性が示唆された。さらに、過去のアデノウイルスベクターにおける研究では、抗 knob 抗体存在下において培養上清や体液を介した標的細胞への感染は、抗 knob 抗体の影響を受けることが報

告されている²⁷⁾。そのため、Adv5knobの拡散方法が培養上清や体液を介したCARへの結合による場合、周辺細胞への拡散や治療効果に影響が出る可能性が考えられた。しかしながら、抗knob抗体存在下においても、周辺細胞への拡散や治療効果に大きな影響は示されなかったことから、本研究の治療用タンパク質の拡散方法は体液を介さない拡散方法であると考えられる。また、ウイルスベクターを用いた遺伝子治療では肝細胞に取り込まれたウイルスカプシドタンパク質が分解され、MHCクラスIによりカプシド抗原が細胞膜表面に提示された結果、細胞障害性T細胞の攻撃による肝障害が報告されている^{23, 26)}。今回の検討では、Adv5knobに対する免疫が惹起されたマウスでの検討において、Adv5knob発現細胞を投与した群においてもマウス生体免疫による抗腫瘍効果は得られなかった。さらなる検討は必要であるが、Adv5knobのような機能を有するキャリアタンパク質はがんに対する遺伝子治療以外においても、安全性の高いキャリアとなる可能性があると考えられる。また、遺伝子導入効率の低さをウイルスベクターの投与量ではなく、遺伝子導入細胞からの治療用タンパク質の拡散により補うことが可能な本治療戦略はウイルスベクターのカプシド抗原による標的細胞以外への影響も回避可能であると考えられる。

Adv5knobの詳細な拡散メカニズムや構造及びCARとの結合様式を明らかとすることで、Adv5knobの改変による標的指向性の向上や様々な標的分子と結合するキャリアの探索・作製が可能となり、本研究の治療戦略の発展が期待される。

第 2 章 細胞間拡散キャリアタンパク質と標的細胞との相互作用による細胞機能への影響

治療用タンパク質のキャリアは、安全性が高く、生体機能に影響しないことが理想である。しかしながら、本研究の治療戦略で使用するキャリアタンパク質は、細胞膜上に存在する相互作用分子を介して拡散すると考えられることから、相互作用分子への刺激により機能変化を及ぼす可能性が考えられる。例えば、本研究にてキャリアタンパク質として利用した Adv5knob は CAR と相互作用することで周辺細胞へと拡散していく。CAR は 5 型 Adv を含む多くのサブグループの感染受容体として最も広く研究されており^{42, 43)}、細胞間接着の調節に関わる 1 回膜貫通型の膜タンパク質として知られている^{44, 45, 46)}。さらに、CAR への刺激が細胞遊走能などの細胞機能への影響を引き起こす事が報告されている⁴⁷⁾。したがって、がん細胞に対する治療であれば、標的細胞への機能変化は転移や浸潤、さらにはがん細胞の増殖促進などにつながる可能性がある。また、遺伝子治療の対象である炎症性疾患などの場合、細胞間接着への影響によりバリア機能が低下し、炎症反応の悪化を引き起こす可能性も考えられる。したがって、Adv5knob に限らず生体内の相互作用分子を利用して拡散するような分子を用いる際には、生体機能に対する影響を考慮しなければならない。前章までに Adv5knob をキャリアタンパク質として用いた検討により、遺伝子導入細胞で産生された治療用タンパク質が、体液を介さずに標的細胞に拡散するという治療戦略は、遺伝子治療の効果増強に寄与する可能性があることを示してきた。そこで、第 2 章では Adv5knob を用いて、キャリアタンパク質と標的細胞との相互作用による細胞機能への影響について評価を行い、本研究の治療戦略の安全性について考察した。

第1節 キャリアタンパク質と標的細胞との相互作用による細胞機能への影響

キャリアタンパク質である Adv5knob と CAR の相互作用による細胞機能の影響を調べる目的で、代表的な CAR への刺激による機能変化として報告のある細胞遊走について、ヒト肺胞上皮がん細胞 (A549 細胞) を用いて検討した。細胞遊走能の評価として wound healing assay および migration assay を行った。Wound healing assay はコンフルエント状態の細胞に直線状に傷を付け、創傷部位に遊走する細胞を経時的に観察する方法である。また、migration assay は transwell plate に播種した細胞の apical 側から basal 側への遊走を観察する方法である。Migration assay では、basal 側に遊走した細胞を、alamar blue assay にて蛍光強度を測定することで遊走細胞数を定量的に評価した。なお、本節の第2項では A549 細胞の膜上に存在する CAR の発現量に対して十分量の Adv5knob を培養上清に加え、Adv5knob と CAR の結合による細胞機能への影響を検討した。一方、第3項では、本研究のキャリアタンパク質の拡散方法と同様に、同一の CAR に Adv5knob が留まることなく、遺伝子導入細胞から周辺細胞へと拡散する場合における細胞機能への影響について検討した。

第1項 組み換え knob タンパク質の作製及び結合評価

N 末端側に His-tag を付与した 5 型 Adv の knob タンパク質 (His-Adv5knob) の精製及び結合評価を行った。His-Adv5knob を発現する BL21 大腸菌を用い、タンパク質の作製及び精製を行い、CBB 染色及び western blotting 法にて確認した。その結果、約 21 kDa に単独のバンドが見られ、His-Adv5knob の作製及び精製ができたと考えられる (Fig. 18A)。His-Adv5knob の CAR への結合能を SF295 細胞及び CAR 発現 SF295 細胞を用いてフローサイトメトリーにて確認した。その結果、SF295 細胞では細胞表面への結合は確認されなかった。一方で、CAR 発現 SF295 細胞に His-Adv5knob を加えた群では、ヒストグラムがシフトしたことから細胞表面の CAR への結合が確認された (Fig. 18B)。このことから His-Adv5knob は CAR への結合能を有していることが確認された。さらに、CAR を発現している A549 細胞への His-Adv5knob の結合も認められたことから (Fig. 18C、D)、His-Adv5knob の A549 細胞の細胞膜表面への結合は CAR を介していることが示唆された。

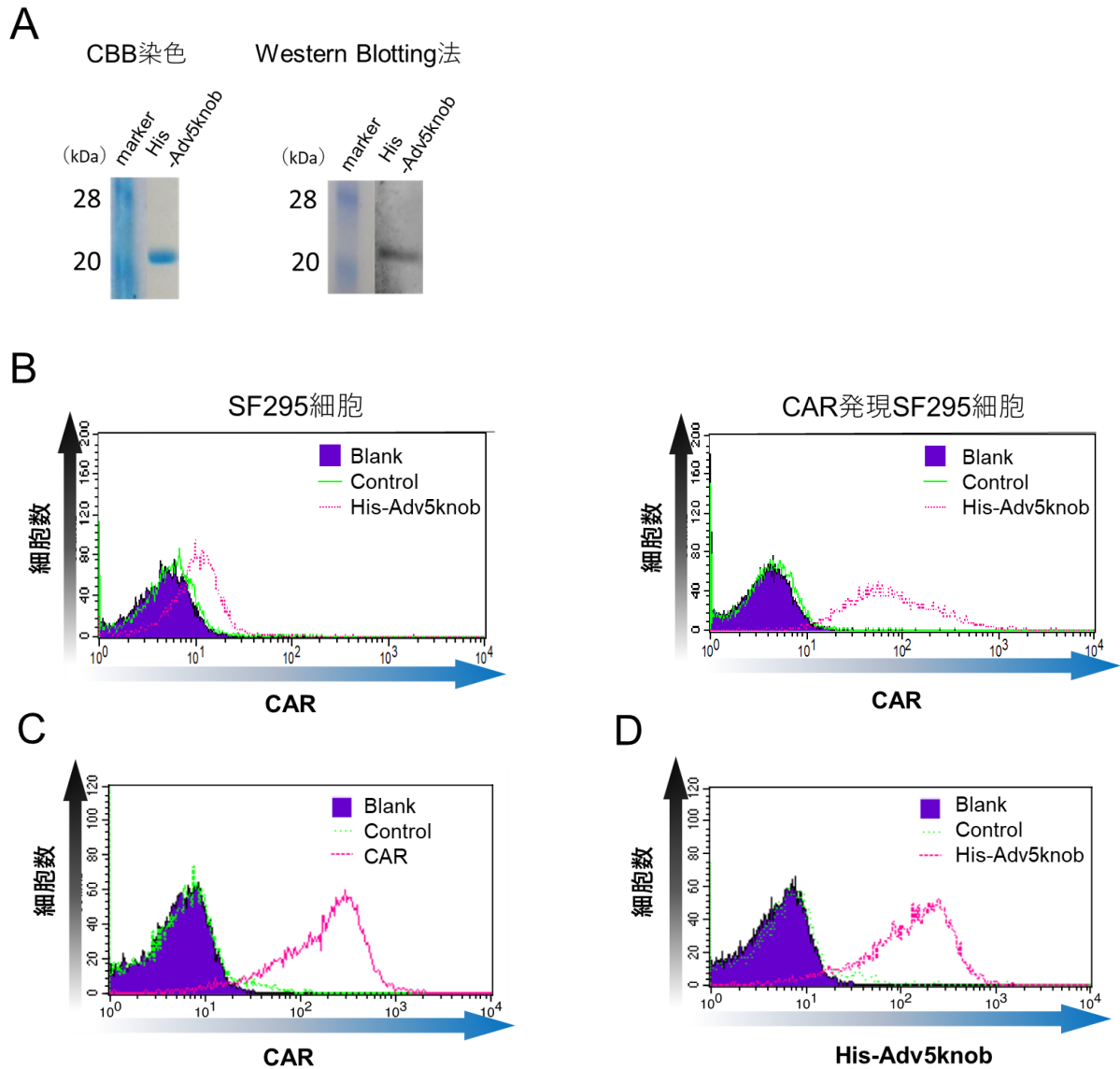


Fig. 18 His-Adv5knob の精製と細胞への結合確認

- A. 精製した His-Adv5knob を SDS-PAGE にて泳動した。次に His-Adv5knob を CBB 染色 (左図)、又は抗 His-tag 抗体及び HRP 標識された 2 次抗体を用いて western blotting 法 (右図) で検出した。
- B. His-Adv5knob を SF295 細胞 (左図) 又は CAR 発現 SF295 細胞 (右図) に 4 °C、1 時間作用させ、抗 His-tag 抗体、Control 抗体および APC 標識された 2 次抗体を用いてフローサイトメトリーにて細胞膜上に結合した Adv5knob を検出した。
- C. A549 細胞を剥離し、抗 CAR 抗体、Control 抗体および APC 標識された 2 次抗体を用いてフローサイトメトリーにて A549 細胞膜上に発現している CAR を検出した。
- D. His-Adv5knob を A549 細胞に 4°C、30 分作用させ、抗 His-tag 抗体および APC 標識された 2 次抗体を用いてフローサイトメトリーにて細胞膜上に結合した Adv5knob を検出した。

第2項 knob タンパク質の CAR との結合による細胞遊走能への影響

前項において His-Adv5knob の CAR への結合能が確認されたことから、Adv5knob と CAR との相互作用による細胞遊走能への影響について wound healing assay 及び migration assay にて検討した。両検討において、細胞遊走能の亢進が報告されている EGF を細胞遊走のポジティブコントロールとして用いた⁴⁸⁾。Wound healing assay ではコンフルエント状態の A549 細胞に直線状に傷を付け、EGF (0.2 µg/mL)、第1項で作製した His-Adv5knob (20 µg/mL) を加えた。傷を付けた時点をも 0 時間とし、24 時間、48 時間後に顕微鏡にて創傷部位への細胞遊走を観察した。また、ImageJ 画像解析ソフトを用いて、顕微鏡観察にて得られた画像の創傷部位の長さを計測し、創傷部位の閉鎖速度を算出した。さらに、migration assay では A549 細胞を transwell plate の apical 側に播種し、basal 側には EGF (0.2 µg/mL)、His-Adv5knob (20 µg/mL) を加え、basal 側に遊走した細胞を顕微鏡にて 100 倍率で観察した。観察後、basal 側に alamar blue 試薬を作用させ遊走細胞数を定量した。Wound healing assay の結果、コントロール群と比較して EGF 添加群、His-Adv5knob 添加群ともに、創傷部位への細胞遊走が促進した (Fig. 19、Table 2)。さらに、migration assay においても、顕微鏡観察と alamar blue assay の結果から、コントロール群と比較して、EGF 添加群、His-Adv5knob 添加群ともに basal 側に遊走した細胞数が上昇した (Fig. 20)。

以上の結果から、Adv5knob と CAR の結合は A549 細胞の細胞遊走能を亢進させることが示された。

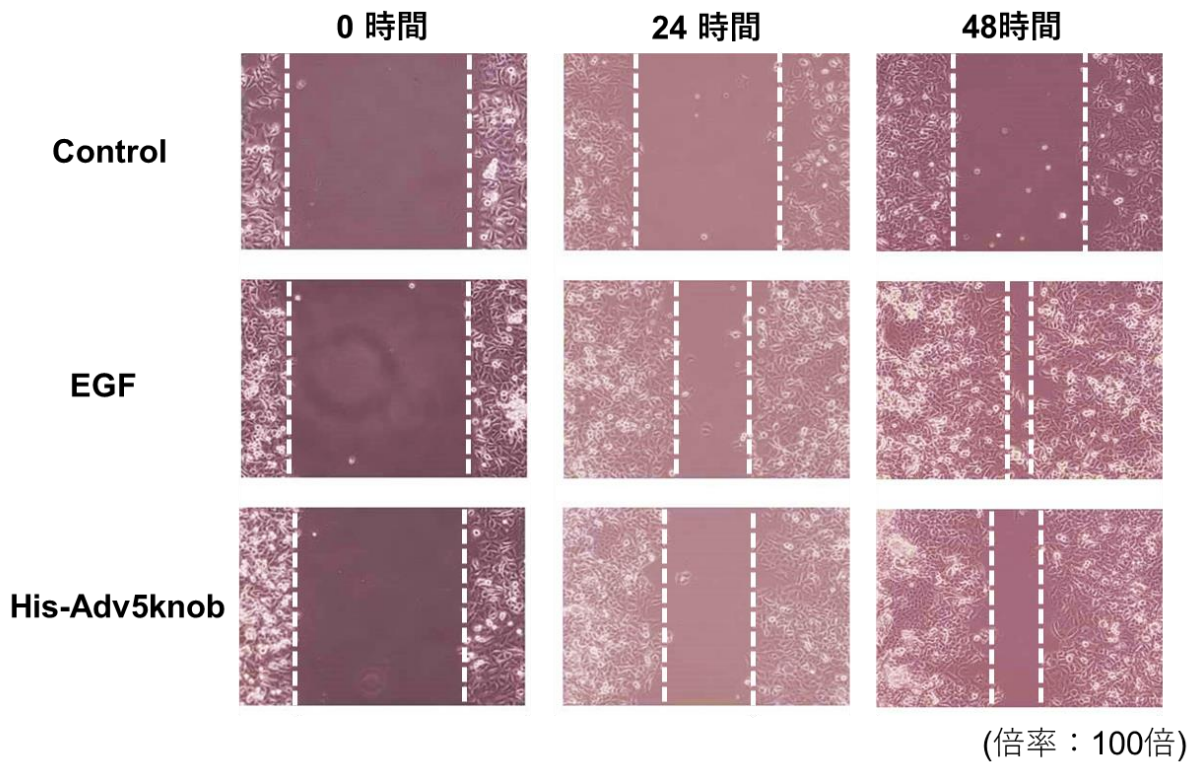
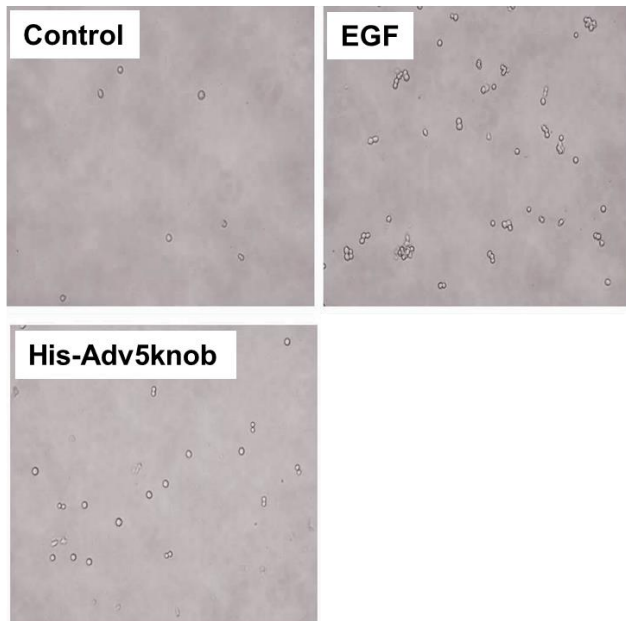


Fig. 19 A549 細胞への His-Adv5knob 添加における創傷部位への細胞遊走
 A549 細胞を播種し、1 日培養した。培養後、直線状に傷を付け、EGF (0.2 $\mu\text{g}/\text{mL}$)、His-Adv5knob (20 $\mu\text{g}/\text{mL}$) を添加した。傷を付けた時点を 0 時間とし、24 時間、48 時間後の創傷部位の状態を顕微鏡にて観察した。なお、白い点線は傷を付けた部分と細胞との境界線を示している。

Table 2 His-Adv5knob 添加における創傷部位の閉鎖速度 (Fig. 19)

	24 時間 (h)	48 時間 (h)
Control	5.89 $\mu\text{m}/\text{h}$	4.83 $\mu\text{m}/\text{h}$
EGF	12.95 $\mu\text{m}/\text{h}$	12.95 $\mu\text{m}/\text{h}$
His-Adv5knob	9.96 $\mu\text{m}/\text{h}$	10.64 $\mu\text{m}/\text{h}$

A



(倍率：100倍)

B

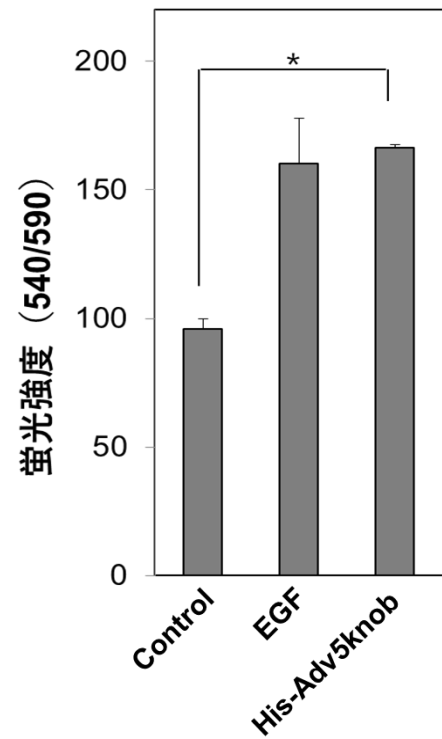


Fig. 20 migration assay による A549 細胞への His-Adv5knob 添加時における細胞遊走数の測定
 A. A549 細胞を transwell plate の apical 側に播種し、basal 側には EGF (0.2 $\mu\text{g}/\text{mL}$)、His-Adv5knob (20 $\mu\text{g}/\text{mL}$) を加え、2 日間培養した。培養後、basal 側に遊走した細胞を顕微鏡にて観察した。
 B. basal 側に遊走した細胞に alamar blue 試薬を培養液にて希釈し、300 $\mu\text{L}/\text{well}$ 加え、培養した。1 日後、培養液の蛍光強度を測定した。

(平均 \pm 標準偏差、n=3、* $p < 0.05$ vs. Control)

第3項 knob タンパク質の CAR を介した周辺細胞への拡散による細胞遊走能への影響

前項において、His-Adv5knob と CAR の結合により細胞遊走能が促進されたことから、Adv5knob の遺伝子導入細胞からの CAR を介した周辺細胞への拡散においても CAR への刺激による細胞遊走能の亢進が考えられる。そこで、本項では Adv5knob 発現細胞からの CAR を介した Adv5knob の周辺細胞への拡散が細胞遊走能に与える影響を評価した。第2項と同様に wound healing assay 及び migration assay にて評価した。

Wound healing assay では Adv5knob 発現 293T 細胞と A549 細胞を共培養後、直線状に傷を付け、ポジティブコントロールとして EGF (0.2 µg/mL) を加えた。傷を付けた時点を 0 時間とし、0 時間、48 時間後の創傷部位の状態を顕微鏡にて観察した。また、ImageJ 画像解析ソフトを用いて、顕微鏡観察にて得られた画像の創傷部位の長さを計測し、創傷部位の閉鎖速度を算出した。さらに、migration assay では Adv5knob 発現 293T 細胞と A549 細胞を transwell plate の apical 側に播種し、ポジティブコントロールとして EGF (0.2 µg/mL) を basal 側に加えた。その後、basal 側に遊走した細胞を顕微鏡にて観察し、alamar blue assay により遊走細胞数を定量した。その結果、wound healing assay において、Adv5knob 発現 293T 細胞と A549 細胞を共培養した場合には、創傷部位への遊走は起こらなかった (Fig. 21、Table 3)。一方、EGF を加えて 293T 細胞と A549 細胞を共培養した場合には、創傷部位への遊走が起こった。次に、migration assay においても、Adv5knob 発現 293T 細胞と A549 細胞を共培養した場合には EGF 作用群と比較して、basal 側に遊走した細胞数は増加しなかった (Fig. 22A)。また、遊走細胞を定量的に測定した際においても、同様の結果となった (Fig. 22B)。以上の結果から、遺伝子導入細胞から Adv5knob が CAR を介して周辺細胞へ拡散する際には、標的細胞に対して細胞遊走などの機能変化を及ぼさないことが示唆された。

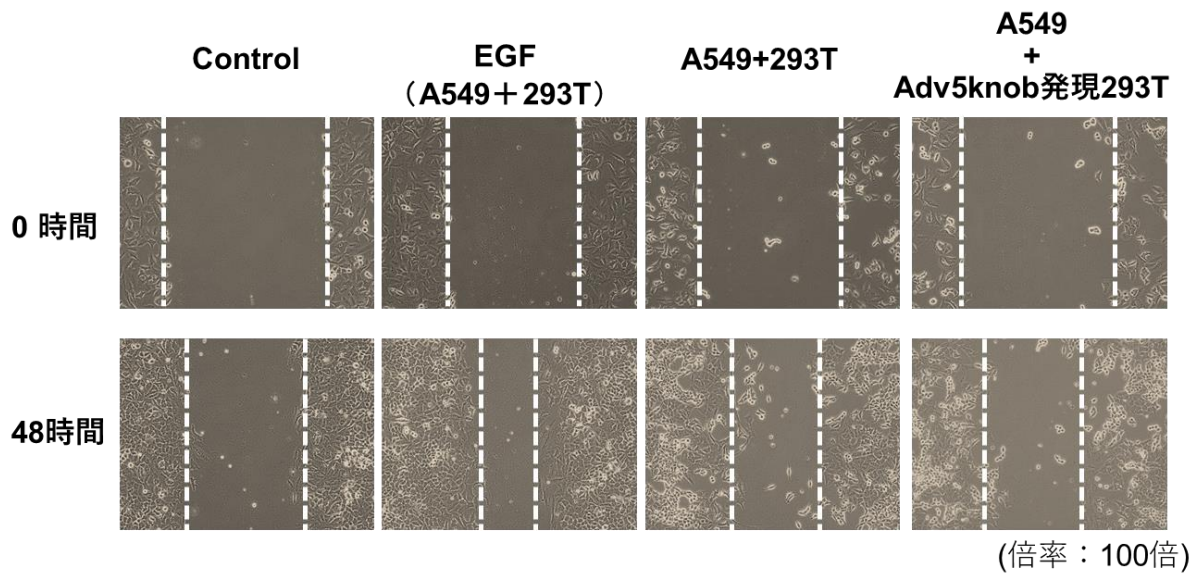


Fig. 21 Adv5knob 発現 293T 細胞の共培養時における A549 細胞の創傷部位への細胞遊走
 A549 細胞と Adv5knob 発現 293T を各 1.5×10^4 cells/well になるように 6 well plate に播種し、1 日培養した。翌日、培養液を除去後、250 μ L のピペットチップで細胞に直線状に創傷をつけ、PBS 250 μ L で洗浄後、培養液を加えさらに培養した。この時点をも 0 時間とし、48 時間後に顕微鏡にて観察を行った。Control 群は A549 細胞のみを 3.0×10^4 cells/well になるように 6 well plate に播種した。なお、白い点線は傷を付けた部分と細胞との境界線を示している。

Table 3 Adv5knob 発現 293T 細胞の共培養時における創傷部位の閉鎖速度 (Fig. 21)

	48 時間 (h)
Control	5.13 μ m/h
EGF (293T + A549)	8.53 μ m/h
A549 + 293T	5.70 μ m/h
A549 + Adv5knob 発現 293T	5.31 μ m/h

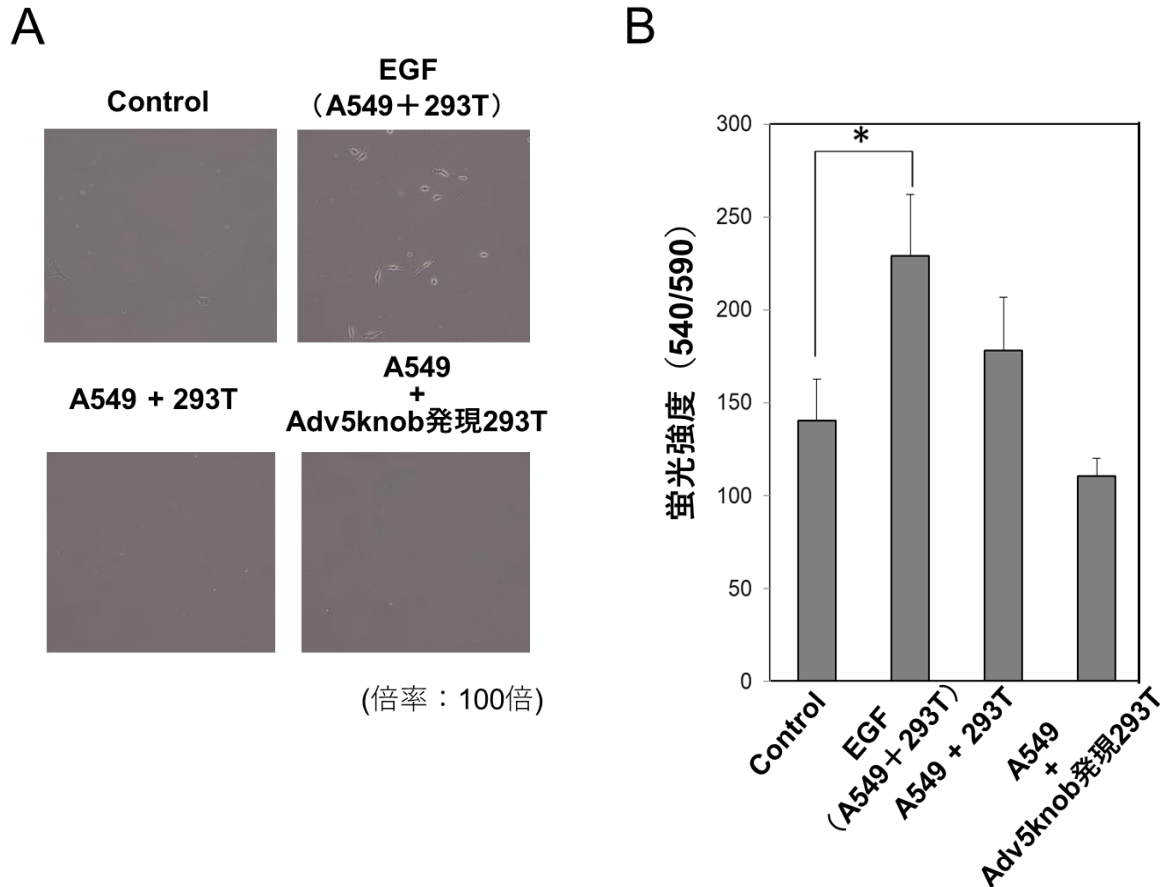


Fig. 22 Adv5knob 発現 293T 細胞の共培養時における A549 細胞の遊走細胞数の測定

A. A549 細胞と Adv5knob 発現 293T 細胞を各 1.5×10^4 cells/well になるように 24 well transwell plate の apical 側に播種した。2 日間培養後、basal 側の遊走細胞を顕微鏡にて観察した。ポジティブコントロールとして EGF (0.2 $\mu\text{g}/\text{mL}$) を basal 側に加えた。Control 群は A549 細胞のみを 3×10^4 cells/well になるように 24 well transwell plate に播種した。

B. basal 側に遊走した細胞に alamar blue 試薬を培養液にて希釈し、300 $\mu\text{L}/\text{well}$ 加え、1 日培養した。培養後、培養液の蛍光強度を測定した。(平均 \pm 標準偏差、 $n=3$ 、* $p < 0.05$)

第2節 考察

治療用タンパク質を遺伝子導入細胞から生体内の特定の相互作用分子との結合を介して標的細胞に拡散させる治療戦略では、治療用タンパク質のキャリアタンパク質による生体への影響について考慮する必要がある。第1章において Adv5knob をキャリアタンパク質として利用することで、治療用タンパク質を遺伝子導入細胞から拡散させる治療戦略が有用であることが示唆された。そこで、生体内の特定の相互作用分子との結合を介して拡散するキャリアタンパク質による生体機能への影響を評価するために、Adv5knob とその相互作用分子である CAR に着目して検討した。Adv の感染メカニズムの解明に用いられており、Adv 感染時に汎用される A549 細胞を用い、CAR 刺激による機能変化として報告のある細胞遊走能に関して特に検討した。まず A549 細胞に Adv5knob を作用させ、Adv5knob の結合による細胞遊走能の変化について検討したところ、ポジティブコントロールとして用いた EGF 添加群と同程度に細胞遊走能の亢進が起こった (Fig. 19、20、Table 2)。Adv5knob の相互作用分子である CAR は代表的なバリア機能である TJ の構成因子であり、細胞間結合に関わっている。CAR を感染第一受容体として結合する Adv5 の感染によりバリア機能が低下し、細胞間結合が減退するといった報告があることから⁴²⁾、今回の Adv5knob と CAR の結合による細胞遊走能の亢進も、細胞間接着を調節することにより誘導された可能性が考えられる。さらに、Adv5 感染時には上皮細胞の浸潤や遊走の促進に関わる PI3K/Akt のシグナル伝達経路の活性化を伴うことが報告されていることから^{49,50,51)}、Adv5knob と CAR の結合によってシグナル伝達経路の活性化が細胞遊走能の亢進を引き起こした可能性も考えられる。一方、遺伝子導入細胞からの Adv5knob の周辺細胞への拡散による細胞遊走能の亢進を検討したところ、EGF 添加群のみで遊走がみられ、Adv5knob 発現 293T 細胞と A549 細胞を共培養した群においては細胞遊走能の亢進はみられなかった (Fig. 21、22、Table 3)。培養上清中への添加と細胞間拡散による Adv5knob の A549 細胞への供給方法の違いにより、結果が異なることから、CAR 刺激による、細胞遊走シグナルが関与すると考えられる。培養上清に Adv5knob を添加した検討において、CAR 発現量に対して十分量の Adv5knob が作用されている (Fig. 18C、D) ため、細胞膜上に存在する Adv5knob は拡散せずに、同一の CAR に留まり細胞遊走に関わるシグナル伝達が起こりやすい状況であったと考えられる。一方で、Adv5knob が発現細胞から周辺細胞へ拡散する場合には、Adv5knob は同一の CAR に留まることなく拡散していくことから、シグナル伝達が起きにくいと考えられる。これらのことから、キ

キャリアタンパク質として標的細胞に特異的に結合することを目的としたキャリアタンパク質は、相互作用分子との結合により標的細胞に対しての機能変化を及ぼすが、Adv5knobのように拡散性を有する分子では標的細胞への影響は少ない可能性がある。

今回、治療戦略の有用性を評価するために Adv5knob を用いたが、疾患ごとに治療標的となる組織や細胞で発現量の上昇がみられる分子、又は特定の組織や細胞でのみ発現する分子を標的としたキャリアタンパク質を用いることで、治療効果の増強や安全性の向上が得られる可能性がある。さらなる検討は必要であるものの、同一の受容体に留まることなく拡散するようなタンパク質をキャリアとして遺伝子治療に応用した場合には、今回の検討で得られた結果のように標的細胞への機能変化は起こりにくい可能性がある。

これらのことから、遺伝子導入細胞から相互作用分子特異的に拡散するようなキャリアタンパク質を用いることで安全性が高く、生体への影響を最小限にした遺伝子治療戦略が可能となると期待される。

【総括】

遺伝子治療は遺伝子導入方法の開発や改良によって、対象疾患が遺伝子疾患のみではなく幅広い疾患に対して用いられるようになり、今後さらなる発展が期待されている治療法である。しかしながら、遺伝子導入効率の低さや副作用など様々な問題がある。そこで本研究では遺伝子治療が抱える問題を克服し、さらなる遺伝子治療の有用性や安全性を可能とするような治療戦略として、遺伝子導入細胞で産生された治療用タンパク質を標的細胞へ体液を介さずに拡散させることが有効であると考え、その有用性について検証した。

第1章では、本研究の治療戦略の有効性を示すために、Adv5のカプシドタンパク質である Adv5knob をキャリアタンパク質として利用し、遺伝子治療による抗腫瘍実験を行った。まず、細胞傷害性を有する NCTXA を融合した NCTXA-Adv5knob の抗腫瘍効果を評価した。その結果、hCAR-B16 細胞で作製した担がんマウスでは、NCTXA-Adv5knob 発現細胞の投与により、有意に腫瘍体積の増大は抑制された。また、NCTXA-Adv5knob が拡散できない CAR 陰性 B16 細胞では腫瘍体積の増大が抑制されなかったことから、NCTXA-Adv5knob の拡散は CAR 特異的に起こることで抗腫瘍効果が得られることが示唆された。また、発現プラスミドを腫瘍内に直接投与する検討においても、hCAR-B16 細胞で作製した担がんマウスでのみ、NCTXA-Adv5knob 発現プラスミド投与群は、NCTXA 単独発現プラスミド投与群に比べて、腫瘍体積の増大が抑制され、有意な抗腫瘍効果が得られた。以上の結果より、Adv5knob をキャリアタンパク質として治療用タンパク質に融合化することによって、治療用タンパク質が相互作用分子特異的に遺伝子導入細胞の膜上に分布し、遺伝子導入細胞以外にも相互作用分子特異的に拡散が可能であり、本研究の治療戦略が治療用タンパク質の供給制御や標的化が可能な治療戦略であることが示された。一方、周辺細胞へと拡散するようなキャリアタンパク質は生体の免疫系に捕捉され、そのキャリア機能が減弱してしまう可能性が考えられる。そこで、キャリアタンパク質に対する抗体存在下での拡散機能について評価した結果、*in vitro* 及び *in vivo* 実験においてキャリアタンパク質の機能に大きな影響はないことが示された。また、この結果は本研究の治療用タンパク質の拡散方法が体液を介さない拡散方法であることを示しており、本治療戦略が分泌型タンパク質を用いた場合とは大きく異なる治療用タンパク質の拡散方法を有することが示された。

第2章では、治療用タンパク質のキャリアは、安全性が高く、生体に対して影響を及ぼさないことが理想であることから、キャリアタンパク質の作用による細胞機能への影響について検討した。その結果、Adv5knobの周辺細胞への拡散では細胞遊走能の亢進は起こらず、細胞間拡散能を有するキャリアタンパク質は標的細胞への機能変化を伴わない可能性が示唆された。

以上の結果より、本研究の治療用タンパク質を生体内の特定の相互作用分子との結合を介して標的細胞に拡散させる治療戦略は、遺伝子治療の効果増強を可能とすることが示唆された。さらに、体液を介さずに細胞間拡散が可能なタンパク質を治療用タンパク質のキャリアとして利用し、標的組織内に拡散させる戦略は、これまでの戦略とは大きく異なり、有効性及び安全性の面において大きく遺伝子治療の発展に貢献できる可能性がある。本研究は、今後さらに発展していく遺伝子治療において、既存の遺伝子治療の有用性を向上させるような戦略であり、さらなる発展に貢献できると考えられる。

【実験の部】

第1章に関する検討

細胞の培養

B16 細胞およびヒト CAR (hCAR) 発現 B16 細胞は 37 °C、5% CO₂ の条件下で、10% FBS (Sigma-Aldrich) 、1% Penicillin-streptomycin mixed solution (ナカライテスク) を含む Minimum Essential eagle's medium (MEM、ナカライテスク) にて培養した。293T 細胞、293T-GFP 細胞は 37 °C、5% CO₂ の条件下で、10% Fetal Bovine Serum (FBS、Sigma-Aldrich) 、1% Penicillin-streptomycin mixed solution を含む Dulbecco's modified eagle's medium (DMEM、ナカライテスク) にて培養した。

各種発現細胞は、目的となるタンパク質の遺伝子をコードしたレンチウイルスベクターを用いて作製した。この時、限界希釈法あるいは Cell Sorter SH800 (SONY) により、発現細胞のみを分離し、検討に用いた。

第1節

1. コレラ毒素 A サブユニット融合 5 型 Adv の knob タンパク質 (NCTXA-Adv5knob) の細胞膜上への分布

1-1. 各種タンパク質発現細胞の調製

hCAR-B16 細胞を 6 well plate に 3×10^5 cells/well で播種し、約 16 時間培養した。その後、well 中の培養液を吸引除去し、ダルベッコりん酸緩生理食塩水 (PBS、ナカライテスク) を加えて洗浄を行い、10% FBS を含む MEM を再び加えた。次に 1.5 mL チューブに Opti-MEM (GIBCO) 123.2 μ L、Lipofectamine[®] 3000 Reagent (Invitrogen) 4 μ L を順に加え、よくピペッティングを行った (Tube A)。続いて、1.5 mL チューブに Opti-MEM 123.2 μ L、各プラスミド (pCMV-Adv5knob-FLAG IRES GFP、pCMV-NCTXA IRES GFP、pCMV-NCTXA-Adv5knob Δ F(AB)-FLAG IRES GFP、NCTXA-Adv5knob-FLAG IRES GFP) 2 μ g、P3000 5 μ L (Invitrogen) を順に加え、よくピペッティングを行い、室温で 5 分間静置した (Tube B)。5 分後、Tube B を Tube A に加え、よくピペッティングを行い、室温で 5 分間静置し、Transfection 試薬とした。調製した Transfection 試薬を 6 well plate に加えて 37 °C、5% CO₂ の条件下にて約 16 時間培養した。

1-2. 抗体作用及びフローサイトメトリー解析

Transfection 試薬を加えてから 16 時間後に、2.5 g/L-Trypsin/1 mmol/L-EDTA (ナカライテスク) を用いて細胞を剥離し、1.5 mL チューブに移した。液量が 1 mL となるように PBS を加え、2300 ×g で 1 分間遠心分離し、上清を除去した。PBS による洗浄を計 3 回行った後に、1 次抗体として、Anti-DDDDK-tag mAb (1000 倍希釈、Clone FLA-1、MEDICAL&BIOLOGICAL LABORATORIES) を 4°C で 1 時間作用させた。作用後、PBS を 1 mL 加え、2300 ×g で 1 分間遠心分離し、上清を除去した。PBS による洗浄を計 3 回行った後、2 次抗体として、allophycocyanin crosslinked goat anti-mouse IgG (H+L) (2000 倍希釈、invitrogen) を 4°C で 1 時間作用させた。PBS を 1 mL 加え、2300 ×g で 1 分間遠心分離し上清を除去した。PBS による洗浄を計 3 回行った後、適当な量の PBS を加えて懸濁し、各サンプルの蛍光強度をフローサイトメトリー (FACSCalibur、Becton Dickinson) で測定した。

2. コレラ毒素 A サブユニット融合 5 型 Adv の knob タンパク質 (NCTXA-Adv5knob) の周辺細胞への拡散

2-1. 各種タンパク質発現細胞の調整

293T-GFP 細胞を 4×10^5 cells/well で 6 well plate に播種し、37 °C、5% CO₂ の条件下にて 1 日培養した。pCMV-Adv5knob-FLAG、pCMV-NCTXA、pCMV-NCTXA-Adv5knob Δ F(AB)-FLAG、pCMV-NCTXA-Adv5knob-FLAG をオートクレーブで滅菌した超純水 97 μ L および 2 M CaCl₂ 19 μ L に加え、氷上に 5 分間置き、溶液を冷やした。その後、2×HEPES buffered saline (Sigma-Aldrich) 159 μ L を 1 滴ずつ攪拌しながら加え、氷上に 20 分間静置した。前日に播種した 293T-GFP 細胞の培養液を吸引除去した後、40 μ M となるように 10 mM chloroquine (Sigma-Aldrich) を含有させた培養液を 1.5 mL/well で加えた。20 分後、プラスミドの混合溶液を 1 滴ずつ well に加え、37 °C、5% CO₂ の条件下にて 1 日培養した。

2-2. コレラ毒素 A サブユニット融合 5 型 Adv の knob タンパク質 (NCTXA-Adv5knob) の周辺細胞への拡散

プラスミドを導入した 293T-GFP 細胞を hCAR-B16 細胞および B16 細胞と各 3×10^5 cells/well ずつ 6 well plate に播種し、37 °C、5% CO₂ の条件下にて 1 日共培養した。以下、の抗体作用およびフローサイトメトリー (FACSCalibur) 解析は、「実験の部 第 1 章、第 1 節、1-2」に準じて行った。

3. hCAR 発現 B16 細胞担がんマウスにおけるコレラ毒素 A サブユニット融合 5 型 Adv の knob タンパク質 (NCTXA-Adv5knob) 発現細胞投与による抗腫瘍効果

3-1. 担がんマウスの作製

C57BL/6 マウス (週齢 7~8 週、メス、日本 SLC) を用いて検討を行った。購入後 1 週間程度、飼育環境に馴化させた。hCAR-B16 細胞をそれぞれ 1×10^6 cells/50 μ L PBS/匹で腹部皮下に移植し、移植した日を Day 0 とした。

3-2. NCTXA-Adv5knob-FLAG 発現細胞の調製

「実験の部 第 1 章、第 1 節、1-1」に準じて、hCAR-B16 細胞に pCMV-Adv5knob-FLAG IRES GFP、pCMV-NCTXA IRES GFP、pCMV-NCTXA-Adv5knob Δ F(AB)-FLAG IRES GFP、pCMV-NCTXA-Adv5knob-FLAG IRES GFP を遺伝子導入した。

3-2. 遺伝子導入細胞の腫瘍内投与及び腫瘍径の測定

遺伝子導入した各細胞を 2.5 g/L-Trypsin/1 mmol/L-EDTA を用いて細胞を剥離し、1.5 mL チューブに移した。液量が 1 mL となるように PBS を加え、2300 \times g で 1 分間遠心分離し、上清を除去した。PBS による洗浄を計 2 回行った後、 2×10^5 cells/50 μ L PBS ずつ腫瘍内に Day8、10、12 に投与した。腫瘍径は、2 日ごとに測定し、「腫瘍体積 (mm^3) = $a \times b \times b/2$ (a : 腫瘍の長径 (mm) 、b : 腫瘍の短径 (mm))」の計算式に基づき、腫瘍体積を算出した。

この時、投与した細胞の GFP 陽性細胞の割合をフローサイトメトリー (FACSCalibur) にて測定し、遺伝子導入効率を比較した。

4. 免疫組織染色による腫瘍組織内の観察

4-1. NCTXA-Adv5knob-FLAG 発現 hCAR-B16 細胞の調製

hCAR-B16 細胞を 6 well plate に 4×10^5 cells/well で播種し、well 中に培養液が 2 mL となるように加えた。次に 1.5mL チューブに Opti-MEM 300 μ L、プラスミド (pCMV-NCTXA-Adv5knob Δ F(AB)-FLAG、NCTXA-Adv5knob-FLAG) 5 μ g、Lipofectamine[®] 2000 Reagent (Invitrogen) 10 μ L を順に加え、室温で 25 分間静置し、Transfection 試薬とした。最後に調製した Transfection 試薬を 6 well plate に加えて 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ の条件下にて 1 日間培養した。上記は 1 well 当たりの量として記載した。

4-2. 遺伝子導入細胞の腫瘍内への投与

遺伝子導入した各細胞を 2.5 g/L-Trypsin/1 mmol-EDTA を用いて剥離し、1 well ごとに 1.5mL チューブに回収し、PBS にて洗浄した。PBS にて洗浄後、 2×10^5 cells/50 μ L PBS となるように調製し、腫瘍内に投与した。

4-3. 腫瘍の摘出及び免疫組織染色

マウスに麻酔をかけ、腫瘍を摘出し、10% 中性緩衝ホルマリン液 (Wako) に浸し固定化をした。その後、HE 染色、活性化 Caspase-3 染色 (公益財団法人 実験動物中央研究所 病理解析センターへ委託) をし、オールインワン蛍光顕微鏡 (Biozero BZ-8000、キーエンス) を用いて画像を取得した。

第 2 節

1. His-tag を付与した 5 型 Adv の knob タンパク質 (His-Adv5knob) の作製・精製

1-1. His-Adv5knob の発現

5 μ L の BL21 (DE3) Competent Cells (Novagen) に His-tag 融合タンパク質発現ベクター (pET16b-His-Adv5knob) を 1 μ L 用いて大腸菌トランスフォーメーションを行い、アンピシリン含有の LB 培地プレート (最終濃度 50 μ g/mL) に播種後、37 $^{\circ}$ C にて一晩インキュベートし、大腸菌コロニーを作製した。

1-2. His-Adv5knob の精製

作製した大腸菌コロニーを、アンピシリンを最終濃度 50 μ g/mL となるように加えた LB 培地 (LA 培地) 2 mL に加え、37 $^{\circ}$ C で 8 時間振とう培養した。その後、大腸菌液を LA 培地 50 mL に加え、37 $^{\circ}$ C で 16 時間振とう培養し、さらに大腸菌液を LA 培地 500 mL に加え、37 $^{\circ}$ C で約 3 時間振とう培養した。その後、IPTG を 0.8 mM となるように加え、37 $^{\circ}$ C で約 3 時間振とう培養し、590 \times g において 10 分間遠心分離した後に沈澱を回収した。

大腸菌に発現させた His-Adv5knob をアフィニティークロマトグラフィーにより精製した。LA 培地 100 mL につき 1 mL の non urea Buffer A (10 mM Tris-HCl (pH 8.0)、400 mM NaCl、5 mM MgCl₂、1 mM 2-mercaptoethanol、10% glycerol) を加えた後、氷冷しながら超音波処理を行い、大腸菌を破碎した。破碎した大腸菌を 11,000 \times g で 15 分間遠心分離し、上清 (E. coli lysate) を回収した。予め Buffer A 1 mL を流して平衡化しておいた His-tag 精製カラム (HisTrapTM HP、GE Healthcare Bio-Sciences AB) に E. coli

lysate を流し、His-tag 融合タンパク質を吸着させた。100 mM imidazole (Sigma-Aldrich) 溶出液 10 mL で洗浄し、400 mM imidazole 溶出液 2 mL で吸着した His-tag 融合タンパク質を溶出させた。

1-3. His-Adv5knob の buffer 置換

His-tag 融合タンパク質を溶解させた buffer は imidazole を含有していることから、PBS へ置換するために、PD-10 column (GE Healthcare Bio-Sciences AB) を用いたゲルろ過クロマトグラフィーを行った。予め PD-10 column に PBS を 10 mL 流して平衡化しておき、精製した溶出液を 2 mL 流した。その後、1 mL ずつ PBS を流し溶出液を分取した。

1-4. タンパク定量

検量線を得るために、10 mg/mL BSA を 1000、500、250、125、62.5、31.25、15.625、0 µg/mL となるように PBS で希釈した。検量線用の溶液と His-Adv5knob 溶液をそれぞれ 50 µL ずつ 96 wells plate に加えた。検量線用の溶液は 2 well ずつ加え、平均値から検量線を得た。溶液を加えた well に BCATM Protein Assay (Reagent A :BCATM Protein Assay Reagent B = 50:1) で調製した溶液を 100 µL ずつ加え、暗所にて 30 分間反応させた。波長 560 nm で吸光度を測定し、濃度を算出した。

2. knob タンパク質に対する抗体保有マウスの作製

C57BL/6 マウス (週齢 17 週、メス、日本 SLC) を用いて検討を行った。PBS で調製した LPS (Sigma-Aldrich) を 5 µg/body で腹腔内投与した。その後、精製した His-Adv5knob を PBS で調製後、20 µg/body で背部皮下投与した。抗原の投与は、5 日間隔で計 4 回行った。4 回目の投与から 3 日後にマウスに麻酔をかけ、眼底採血を行った。採取した試料を 11,000 ×g で 20 分間遠心分離し、上清を回収して血清とした。

3. OVA 免疫マウスの作製

OVA (SIGMA-Aldrich) を PBS で調製し、抗原とした。「実験の部 第 1 章、第 2 節、2-1」に準じて、抗原投与および眼底採血を行い、血清を採取した。

4. 血清中抗 knob 抗体 の存在 の確認

4-1. Adv5knob-FLAG タンパク質 の作製 ・精製

293T 細胞を 100 mm dish に 1.2×10^6 cells 播種し、 37°C 、 $5\% \text{CO}_2$ 条件下にて 1 日培養した。翌日、pCMV-Adv5knob-FLAG 23 μg をオートクレーブにて滅菌した超純水 568 μL 及び 2 M CaCl_2 111 μL に加え、5 分間氷上に静置した。2×HEPES buffered saline 930 μL を一滴ずつ攪拌しながら加え、20 分間氷上に静置した。前日に培養した細胞の培養液を除去し、40 μM となるように 10 mM chloroquine を含有させた培養液を 8.7 mL 加えた。20 分後、プラスミド混合溶液を 1 滴ずつ well に加え、 37°C 、 $5\% \text{CO}_2$ の条件下にて 6 時間培養した。作用溶液を除去し、培養液を加え、 37°C 、 $5\% \text{CO}_2$ の条件下にて 1 日間培養した。翌日、培養液を除去し、PBS を 1 mL 加え洗浄した。PBS を除去し、1% TritonX-100[®] (ナカライテスク) /PBS を 1 mL 加えた後、CELL SCRAPER (IWAKI) を用いて細胞を剥離した。超音波処理 (20 秒超音波、40 秒休みを 3 回繰り返した) を行い、遠心 ($11,000 \times g$ 、20 分、 4°C) により上清を回収し Millex[®]-GV Filter Unit (Merck Millipore) に通して細胞溶解液 (Lysate) とした。カラムに 70% Ethanol 10 mL、TBS 10 mL の順に流し、カラム内を消毒・洗浄した。Anti-DDDDK-FLAG Gel (MEDICAL&BIOLOGICAL LABORATORIES) 1mL をカラムに加えた。Lysate を 3 回通し、Adv5knob-FLAG を吸着させた。TBS を 20 mL 流し、洗浄した。TBS にて 50 倍希釈した 0.1 mg/mL FLAG peptide (Sigma-Aldrich) を 2 mL 加え、氷上にて 10 分間静置した後、Adv5knob-FLAG を溶出した。

4-2. ELISA 法によるマウス血清中の抗 knob 抗体 の確認

精製した Adv5knob-FLAG 5 μL に Coating Buffer A (5×) (BioLegend) の最終希釈倍率が 5 倍となるように超純水を加え混合し、F96 Maxisorp NUNC-Immuno Plate (Thermo Scientific) に 100 $\mu\text{L}/\text{well}$ 加え、 4°C で約 16 時間、固相化した。キムタオルを用いて溶液を除去し、0.05% Polyoxyethylene (20) Sorbitan Monolaurate (Wako) 含有の TBS (TBS-T) を 200 $\mu\text{L}/\text{well}$ 加え洗浄し、キムタオルを用いて除去した。この操作を 4 回繰り返した。以降洗浄はこの操作を行った。20 mg/mL ブロックエース[®]粉末 (雪印メグミルク) /TBS-T を 400 $\mu\text{L}/\text{well}$ 加え、室温で 1 時間振とう作用させた。洗浄後、20 mg/mL ブロックエース[®]粉末にて 100 倍希釈した各種マウス血清 (「実験の部 第 2 節」にて Adv5knob 免疫マウス、OVA 免疫マウスおよび Control マウスそれぞれから採取したもの) を 100 $\mu\text{L}/\text{well}$ 加え、室温で 3 時間振とう作用させた。洗浄後、20 mg/mL ブロックエース[®]粉末にて 10000 倍希釈した Goat anti mouse IgG (H&L), horseradish peroxidase

labeled (American Qualex Antibodies)を 100 μ L/well 加え、室温で 1 時間振とう作用させた。洗浄後、ELISA POD Substrate TMB Kit (ナカライテスク) を 100 μ L/well 加え、暗所にて 30 分間作用させた。十分発色したのを確認後、反応停止液 (0.1 M 硫酸、ナカライテスク) を 100 μ L/well 加え、450 nm の吸光度を Thermo Scientific Varioskan[®]Flash (Therm Frisher Scientific) により測定した。

4-3. ELISA 法によるマウス血清中の抗 OVA 抗体の確認

各種マウス血清を用いて、ELISA キット (Anti-Ovalbumin IgG₁ (mouse) ELISA Kit) にて吸光度を測定し、血清中の OVA 特異的 IgG を検出した。

5. *in vitro* における knob タンパク質のキャリア機能への抗 knob 抗体の影響

「実験の部 第 1 章、第 2 節、2-1」に準じて作製した Adv5knob-FLAG 発現 293T 細胞を 293T-GFP 細胞と各 2.5×10^5 cells/well ずつ加え、各種マウス血清を添加し、100 倍希釈となるように調製した培養液 2 mL で懸濁し、6 well plate にて 37°C、5 % CO₂ の条件下にて 1 日培養した。以下、の抗体作用およびフローサイトメトリー (FACSCalibur) 解析は、「実験の部 第 1 章、第 1 節、1-2」に準じて行った。

6. *in vivo* におけるコレラ毒素 A サブユニット融合 5 型 Adv の knob タンパク質 (NCTXA-Adv5knob) の抗腫瘍効果への抗 knob 抗体の影響

6-1. 担がんマウスの作製

「実験の部 第 2 節、2 及び 3」で作製した抗原免疫マウスを用いて検討を行った。担がんマウスは「実験の部 第 1 節、3-1」に準じて作製した。

6-2. NCTXA-Adv5knob-FLAG 発現 hCAR-B16 細胞の調製

「実験の部 第 1 節、1-1」に準じて、NCTXA-Adv5knob-FLAG 発現 hCAR-B16 細胞を作製した。

6-3. 遺伝子導入細胞の腫瘍内への投与および腫瘍体積の測定

「実験の部 第 1 節、3-2」に準じて、NCTXA-Adv5knob-FLAG 発現 hCAR-B16 細胞の腫瘍内への投与及び腫瘍体積の測定を行った。

7. Cell ELISA 法による細胞膜表面に存在する knob タンパク質と抗 knob 抗体の結合確認

「実験の部 第 1 章、第 2 節、2-1」に準じて作製した Adv5knob-FLAG 発現 293T 細胞を剥離し、遠心処理後、上清を除去し、培養液を加えて懸濁し、 4×10^4 cells/well とするよう 96 well plate に播種した。翌日、培養液を除去し、PBS を 150 μ L/well 加え洗浄した。PBS を除去した後、4%-Paraformaldehyde Phosphate Buffer Solution (ナカライテスク) を 100 μ L/well 加え、室温にて 20 分間静置させ、細胞を well に固定化した。その後、PBS を 200 μ L/well 加え洗浄を 5 回繰り返した。以降、洗浄はこの操作を行った。5 回目の洗浄後、PBS を除去し、20 mg/mL ブロックエース[®]粉末/PBS を 150 μ L/well 加え、室温にて 3 時間振とう作用させた。作用溶液を除去後、20 mg/mL ブロックエース[®]粉末/PBS にて 1000 倍希釈した各種マウス血清を 100 μ L/well 加え、4°Cにて 20 時間作用させた。作用溶液を除去後、3 回洗浄し、20 mg/mL ブロックエース[®]粉末/PBS にて 10000 倍希釈した Goat anti mouse IgG (H&L)、horseradish peroxidase labeled を 100 μ L/well 加え、室温にて遮光しながら 2 時間振とう作用させた。洗浄後、最後の 1 回はキムタオルを用いて well 中の水分を十分に除去した。水分を除去したプレートに ELISA POD Substrate TMB Kit を 100 μ L/well 加え暗所にて 30 分間作用させた。十分発色したのを確認後、反応停止液 (0.1 M 硫酸) を 100 μ L/well 加え、450 nm の吸光度を Thermo Scientific Varioskan[®]Flash により測定した。

第2章に関する検討

細胞の培養

A549、SF295、293T 細胞は 37 °C、5% CO₂ の条件下で、10% FBS、1% Penicillin-streptomycin mixed solution、1% MEM 非必須アミノ酸溶液を含む DMEM にて培養した。

各種発現細胞は、目的となるタンパク質の遺伝子をコードしたレンチウイルスベクターを用いて作製した。この時、限界希釈法あるいは Cell Sorter SH800 により、発現細胞のみを分離し、検討に用いた。

第1節

1. His-tag を付与した 5 型 Adv の knob タンパク質 (His-Adv5knob) の作製・精製

1-1. His-Adv5knob の発現

「実験の部 第1章、第2節、1-1」に準じて行った。

1-2. His-Adv5knob の精製

「実験の部 第1章、第2節、1-2」に準じて行った。

1-3. His-Adv5knob の buffer 置換

「実験の部 第1章、第2節、1-3」に準じて行った。

1-4. タンパク定量

「実験の部 第1章、第2節、1-4」に準じて行った。

2. CBB 染色及び western blotting 法による組換え knob タンパク質の検出

2-1. SDS-PAGE

精製したタンパク質溶液に 4×SDS buffer (0.25 M Tris-HCl、20% 2-mercaptoethanol、8% SDS、40% glycerol、0.004% bromophenol blue) を加えて混合した後、97°C で 3 分間熱処理 (BLOCK INCUBATOR BI-525A) を行い、これを電気泳動用サンプルとした。電気泳動装置に Running buffer を加え、15% ポリアクリルアミドゲル (e-PAGEL[®]、ATTO Corporation) をセットした。Pre-stained Protein Markers (BroAdv Range) for SDS-PAGE (ナカライテスク) を 3 μL、サンプル 20 μL を e-PAGEL[®] の well に加え、

SDS-PAGE (0.02 A、1 時間) を行った。

2-2. CBB 染色による検出

ポリアクリルアミドゲルを超純水で洗浄し、CBB Stain one (ナカライテスク) で1時間染色した。その後、超純水でゲルを脱色し、バンドを確認した。

2-3. Western Blotting 法による検出

Immobilon-P membrane[®] (PVDF membrane、Merck Millipore、USA) を 60% Methanol に振とうしながら 5 分間浸透させた。PDVF membrane とブロットィング用ろ紙を Blotting buffer に振とうしながら 20 分以上浸透させた。TRANS-BLOT[®]SD SEMI-DRY TRANSFERCELL (Bio-Rad) をセットし、ろ紙 (No.2 110 mm、ADVANTEC) 、PVDF membrane、ゲル、ろ紙の順に重ね、0.24 A で 20 分間転写した。0.05 % Polyoxyethylene (20) Sorbitan Monolaurate (Wako) 含有の TBS (TBS-T) にブロックエース粉末を溶解し、20 mg/mL の Blocking buffer を調製した。容器中で、PVDF membrane を 20 mg/mL Blocking buffer 10 mL に 4 °C 条件下で約 16 時間浸透させた。翌日、TBS-T で振とうしながら 5 分間×2 回洗浄した。以下洗浄はこの手順で行った。PVDF membrane に 20 mg/mL Blocking buffer により希釈した His-tag Monoclonal Antibody (1000 倍希釈、QIAGEN) を加え、室温にて 1 時間振とう作用させた。洗浄後、20 mg/mL Blocking buffer により希釈した Goat anti-Mouse IgG-h+l HRP Conjugated (20000 倍希釈、BETHYL) を加え、室温で 1 時間振とう作用させた。洗浄後、AmershamTM ECLTM Prime Western Blotting Detection Reagene (A:B = 1:1、GE Healthcare) を調製し、滴下した後 1 分半静置した。TBS-T にて 1 回洗浄した後、ラップに PVDF membrane を挟み、LAS-4000 mini (富士フィルム) にて検出を行った。

3. His-tag を付与した 5 型 Adv の knob タンパク質 (His-Adv5knob) による細胞表面の CAR との結合

SF295 及び CAR 発現 SF295 細胞に 5 mM EDTA/PBS を加え、37 °C で 7 分間作用させ細胞を剥離した。剥離した細胞を 4×10^5 cells ずつ 1.5 mL チューブに移し、液量が 1 mL となるように PBS を加え、2300 \times g で 1 分間遠心分離し、上清を除去した。PBS による洗浄を計 2 回行った後に、His-Adv5knob を 1 サンプル当たり 0.2 μ g となるように細胞に 4 °C で 1 時間作用させた。PBS による洗浄を計 2 回行った後に「実験の部 第 1 章、第 1 節、1-2」に準じて、細胞表面に結合した His-tag 融合タンパク質をフローサ

イトメトリー (FACSCalibur) で検出した。その際に、1 次抗体として Anti-His-tag mAb (clone OGHis、1000 倍希釈、MEDICAL&BIOLOGICAL LABORATORIES) を、2 次抗体として allophycocyanin crosslinked goat anti-mouse IgG (H+L) (1000 倍希釈) を用いた。

4. His-tag を付与した 5 型 Adv の knob タンパク質 (His-Adv5knob) による A549 細胞への結合

A549 細胞を 3×10^5 cells となるように 6 well plate に播種し、 37°C 、5% CO_2 の条件下にて 1 日培養した。1 日培養後、His-Adv5knob を $20 \mu\text{g}/\text{mL}$ となるように細胞に 4°C 、30 分間作用させた。その後上清を除去し、A549 細胞に 5 mM EDTA/PBS を加え、 37°C で 7 分間作用させ細胞を剥離した。剥離した細胞を 1.5 mL チューブに移し、液量が 1 mL となるように PBS を加え、 $2,300 \times g$ で 1 分間遠心分離し、上清を除去した。PBS による洗浄を計 2 回行った後に「実験の部 第 1 章、第 1 節、1-2」に準じて、細胞表面に結合した His-tag 融合タンパク質をフローサイトメトリー (FACSCalibur) で検出した。その際に、1 次抗体として Anti-His-tag mAb (clone OGHis、1000 倍希釈) を、2 次抗体として allophycocyanin crosslinked goat anti-mouse IgG (H+L) (2000 倍希釈) を用いた。

5. knob タンパク質と CAR との結合による細胞遊走能に対する影響

5-1. Wound healing assay による創傷部位への細胞遊走の観察

A549 細胞を 3×10^5 cells/well で 12 well plate に播種し、 37°C 、5% CO_2 の条件下にて 1 日培養した。翌日培養液を除去し、 $250 \mu\text{L}$ のピペットチップで細胞に直線状に創傷を付け、PBS $250 \mu\text{L}$ で洗浄した。培養液を加え、EGF ($0.2 \mu\text{g}/\text{mL}$)、His-Adv5knob ($20 \mu\text{g}/\text{mL}$) になるように調製し、各 well に加えた。この時点を 0 時間とし、24 時間後、48 時間後に創傷部位への遊走を観察した。観察には顕微鏡 (倒立型ルーチン顕微鏡、CKX41、OLYMPUS) 100 倍率にて観察を行った。さらに、ImageJ 画像解析ソフトを用いて、顕微鏡観察にて得られた 0 時間、24 時間、48 時間の創傷部位の長さを測定した。得られた 0 時間の創傷部位の長さ、24 時間、48 時間のそれぞれの創傷部位の長さの差を求め、創傷を付けた 0 時間からの経過時間で割り、創傷部位の閉鎖速度を求めた。今回使用した His-Adv5knob は加える前に大腸菌膜などの不純物を取り除くために Millex[®]-HV Filter Unit ($0.45 \mu\text{m}$ 、13 mm、ミリポア) に通した。また、本実験で用いた培養液は成長因子である FBS を 1% に抑えたものを使用した。

5-2. Migration assay による細胞遊走の観察

A549 細胞を 3×10^4 cells/well になるよう transwell® Permeable Support (8.0 μ m polycarbonate membrane、6.5 mm insert、24 well plate、Coster) の apical 側に播種した。EGF (0.2 μ g/mL)、His-Adv5knob (20 μ g/mL) になるように調製し、basal 側に加えた。37 °C、5 %CO₂ の条件下で 2 日間培養し、細胞を apical 側から basal 側へ遊走させた。培養後、apical 側の insert を取り除き、basal 側に遊走した細胞を顕微鏡にて 100 倍率で観察した。また、遊走した細胞に alamar blue 試薬 (Nalgene) を培養液にて 10 倍希釈し 300 μ L/well 加え、1 日培養した。翌日、100 μ L/well 回収し、蛍光強度 Fluroskan (Fluoroskan Ascent FL.、Labsystems) にて測定した。また、本実験で用いた培養液は成長因子である FBS を 1%に加えたものを使用した。

6. knob タンパク質の CAR を介した周辺細胞への拡散による細胞遊走能に対する影響

6-1. Wound healing assay による創傷部位への細胞遊走の観察

A549 細胞、293T 細胞、Adv5knob 発現 293T 細胞を単培養では 3×10^4 cells/well、共培養では各 1.5×10^5 cells/well で 6 well plate に播種し、37°C、5% CO₂ の条件下にて 1 日培養した。翌日、「実験の部 第 2 章、第 1 節、5-1」に準じて、創傷部位への遊走の観察及び創傷部位の閉鎖速度を求めた。

6-2. Migration assay による細胞遊走の観察

A549 細胞、293T 細胞、Adv5knob 発現 293T 細胞を単培養では 3×10^4 cells/well、共培養では各 1.5×10^4 cells/well になるよう transwell® Permeable Support (8.0 μ m polycarbonate membrane、6.5 mm insert、24 well plate) の apical 側に播種した。培養後、「実験の部 第 2 章、第 1 節、5-2」に準じて、migration assay を行った。

統計学的評価

本論文では、ダネット法及びスチューデント t 検定を用いて、*p* 値を算出し、0.05 を基準に統計学的な評価を行った。

【謝辞】

本稿を終えるにあたり、ご指導ご鞭撻賜りました昭和薬科大学 薬剤学研究室 教授 宇都口 直樹 先生、同研究室 准教授 小泉 直也 先生、同研究室 講師 野村 鉄也 先生、国立医薬品食品衛生研究所 再生・細胞医療製品部 平井 孝昌 先生に謹んで感謝の意を表します。

本研究の主査として本論文のご審査を賜りました昭和薬科大学 薬品分析化学研究室 教授 唐澤 悟 先生、副査としてご審査を賜りました微生物学研究室 教授 金本 大成 先生、生化学研究室 教授 伊東 進 先生に深く感謝致します。

本研究を遂行するにあたり、ご指導ご鞭撻賜りました大阪大学大学院薬学研究科 分子生物学分野 教授 水口 裕之 先生に謹んで感謝の意を表します。

最後に、本研究にあたり多大なご協力いただきました昭和薬科大学 薬剤学研究室 井上 藍里氏、松岡 章名氏、佐々木 有彩氏、鈴木 悠りか氏ならびに同研究室の皆様、さまざまな面で支援していただいたすべての皆様に厚く御礼申し上げます。

【参考文献】

1. Joung, J. K. *et al.* Gene therapy comes of age. *Science* **359**, eaan4672 (2018).
2. Mckiver, B. *et al.* Assessment of current gene therapy practices in hepatocellular carcinoma. *Gastrointest. Disord.* **2**, 469–480 (2020).
3. Bulaklak, K. *et al.* The once and future gene therapy. *Nat. Commun.* **11**, 5820 (2020).
4. Ma, C.-C. *et al.* The approved gene therapy drugs worldwide: from 1998 to 2019. *Biotechnol. Adv.* **40**, 107502 (2020).
5. Up-and-coming gene therapies of 2019. *GEN - Genetic Engineering and Biotechnology News* (2019).
6. Keviv, C. List of gene therapy clinical trials. *Rising Tide Biology* (2019).
7. Wang, F. *et al.* Clinical translation of gene medicine. *J. Gene Med.* **21**, e3108 (2019).
8. Cell and gene therapy catapult. Cell and gene therapy clinical trials. (2019)
9. Uusi-Kerttula, H. *et al.* Oncolytic adenovirus: strategies and insights for vector design and immuno-oncolytic applications. *Viruses* **7**, 6009–6042 (2015).
10. June, C. H. *et al.* Chimeric antigen receptor therapy. *N. Engl. J. Med.* **379**, 64–73 (2018).
11. Newick, K. *et al.* CAR T cell therapy for solid tumors. *Annu. Rev. Med.* **68**, 139–152 (2017).
12. Guedan, S. *et al.* Emerging cellular therapies for cancer. *Annu. Rev. Immunol.* **37**, 145–171 (2019).
13. Yoshio-Hoshino, N. *et al.* Establishment of a new interleukin-6 (IL-6) receptor inhibitor applicable to the gene therapy for IL-6–dependent tumor. *Cancer Res.* **67**, 871–875 (2007).
14. Kim, S. M. *et al.* Gene therapy using TRAIL-secreting human umbilical cord blood–derived mesenchymal stem cells against intracranial glioma. *Cancer Res.* **68**, 9614–9623 (2008).
15. Arabpour, M. *et al.* Receptor-specific TRAIL as a means to achieve targeted elimination of activated hepatic stellate cells. *J. Drug Target.* **25**, 360–369 (2017).
16. Gupta, B. *et al.* Intracellular delivery of large molecules and small particles by cell-penetrating proteins and peptides. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **57**, 637–651 (2005).
17. Flinterman, M. *et al.* Delivery of therapeutic proteins as secretable TAT fusion products. *Mol. Ther.* **17**, 334–342 (2009).

18. Li, Y., Qiu, S., Song, L., Yan, Q. & Yang, G. Secretory Expression of p53(N15)-Ant following Lentivirus-Mediated Gene Transfer Induces Cell Death in Human Cancer Cells. *Cancer Invest.* **26**, 28–34 (2008).
19. 平井孝昌. アデノウイルスカプシドタンパク質の機能解析および DDS 技術への応用に関する研究. (2017).
20. Smith, L. J. *et al.* Gene transfer properties and structural modeling of human stem cell-derived AAV. *Mol. Ther.* **22**, 1625–1634 (2014).
21. Kojima, K. *et al.* Gene therapy improves motor and mental function of aromatic l-amino acid decarboxylase deficiency. *Brain* **142**, 322–333 (2019).
22. Rangarajan, S. *et al.* AAV5–factor VIII gene transfer in severe hemophilia A. *N. Engl. J. Med.* **377**, 2519–2530 (2017).
23. Mendell, J. R. *et al.* Single-dose gene-replacement therapy for spinal muscular atrophy. *N. Engl. J. Med.* **377**, 1713–1722 (2017).
24. Allam, M. *et al.* Cholera toxin triggers apoptosis in human lung cancer cell lines. *Cancer Res.* **57**, 2615–2618 (1997).
25. Bewley, M. *et al.* Structural analysis of the mechanism of adenovirus binding to its human cellular receptor, CAR. *Science* **286**, 1579–1583 (1999).
26. Doshi, B. S. *et al.* Gene therapy for hemophilia: what does the future hold? *Ther. Adv. Hematol.* **9**, 273–293 (2018).
27. Tomita, K. *et al.* Antibodies against adenovirus fiber and penton base proteins inhibit adenovirus vector-mediated transduction in the liver following systemic administration. *Sci. Rep.* **8**:12315 (2018).
28. Stasiak, A. C. *et al.* Human adenovirus binding to host cell receptors: a structural view. *Med. Microbiol. Immunol. (Berl.)* **209**, 325–333 (2020).
29. Seiradake, E. *et al.* Structural and mutational analysis of human Ad37 and canine adenovirus 2 fiber heads in complex with the D1 domain of coxsackie and adenovirus receptor. *J. Biol. Chem.* **281**, 33704–33716 (2006).
30. Lortat-Jacob, H. *et al.* Kinetic analysis of adenovirus fiber binding to its receptor reveals an avidity mechanism for trimeric receptor-ligand interactions. *J. Biol. Chem.* **276**, 9009–9015 (2001).
31. Burckhardt, C. J. *et al.* Drifting motions of the adenovirus receptor CAR and immobile integrins initiate virus uncoating and membrane lytic protein exposure. *Cell Host Microbe* **10**,

105–117 (2011).

32. Kwong, P. *et al.* HIV-1 evades antibody-mediated neutralization through conformational masking of receptor-binding sites. *Nature* **420**, 678–82 (2003).

33. Wyatt, R. *et al.* The antigenic structure of the HIV gp120 envelope glycoprotein. *Nature* **393**, 705–711 (1998).

34. Jooss, K. *et al.* Transduction of dendritic cells by DNA viral vectors directs the immune response to transgene products in muscle fibers. *J. Virol.* **72**, 4212–4223 (1998).

35. Nathwani, A. C. *et al.* Adenovirus-associated virus vector-mediated gene transfer in hemophilia B. *N. Engl. J. Med.* **365**, 2357–2365 (2011).

36. Manno, C. S. *et al.* Successful transduction of liver in hemophilia by AAV-Factor IX and limitations imposed by the host immune response. *Nat. Med.* **12**, 342–347 (2006).

37. Pipe, S. *et al.* Clinical considerations for capsid choice in the development of liver-targeted AAV-based gene transfer. *Mol. Ther. - Methods Clin. Dev.* **15**, 170–178 (2019).

38. Wu, H. *et al.* Double modification of adenovirus fiber with RGD and polylysine motifs improves coxsackievirus–adenovirus receptor-independent gene transfer efficiency. *Hum. Gene Ther.* **13**, 1647–1653 (2002).

39. Haviv, Y. S. *et al.* Adenoviral gene therapy for renal cancer requires retargeting to alternative cellular receptors. *Cancer Res.* **62**, 4273–4281 (2002).

40. Jia, L.-T. *et al.* Specific tumoricidal activity of a secreted proapoptotic protein consisting of HER2 antibody and constitutively active Caspase-3. *Cancer Res.* **63**, 3257–3262 (2003).

41. Thapa, B. *et al.* TRAIL therapy and prospective developments for cancer treatment. *J. Controlled Release* **326**, 335–349 (2020).

42. Bergelson, J. M. *et al.* Isolation of a common receptor for coxsackie B viruses and adenoviruses 2 and 5. *Science* **275**, 1320–1323 (1997).

43. Roelvink, P. *et al.* 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).

44. Patzke, C. *et al.* The coxsackievirus–adenovirus receptor reveals complex homophilic and heterophilic interactions on neural cells. *J. Neurosci.* **30**, 2897–2910 (2010).

45. Raschperger, E. *et al.* The coxsackie- and adenovirus receptor (CAR) is an in vivo marker for epithelial tight junctions, with a potential role in regulating permeability and tissue homeostasis. *Exp. Cell Res.* **312**, 1566–1580 (2006).

46. Ortiz-Zapater, E. *et al.* CAR: A key regulator of adhesion and inflammation. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **89**, 1–5 (2017).
47. Fok, P. T. *et al.* The coxsackie and adenovirus receptor binds microtubules and plays a role in cell migration. *J. Biol. Chem.* **282**, 7512–7521 (2007).
48. Lauand, C. *et al.* Cell cycle synchronization and BrdU incorporation as a tool to study the possible selective elimination of ErbB1 gene in the micronuclei in A549 cells. *Braz. J. Med. Biol. Res.* **48**, 382–391 (2015).
49. Kornberg, L. J. *et al.* Adenoviruses increase endothelial cell proliferation, migration, and tube formation: Partial reversal by the focal adhesion kinase inhibitor, FRNK. *Microvasc. Res.* **73**, 157–162 (2007).
50. Xu, W. *et al.* A new role for the PI3K/Akt signaling pathway in the epithelial-mesenchymal transition. *Cell Adhes. Migr.* **9**, 317–324 (2015).
51. Tamanini, A. *et al.* Interaction of adenovirus type 5 fiber with the coxsackievirus and adenovirus receptor activates inflammatory response in human respiratory cells. *J. Virol.* **80**, 11241–11254 (2006).

【略語一覽】

AAV : adeno-associated virus

Adv : Adenovirus

Adv5knob : knob protein of adenovirus type 5

ADP : adenosine

APC : allophycocyanin

BSA : bovine serum albumin

cAMP : cyclic adenosine monophosphate

CAR : coxsackievirus and adenovirus receptor

CBB : coomassie brilliant blue

DNA : deoxyribonucleic acid

EDTA : ethylenediaminetetraacetic acid

EGF : epidermal growth factor

ELISA : enzyme-linked immune sorbent assay

FBS : fetal bovine serum

GFP : green fluorescent protein

gp120 : glycoprotein 120

His-Adv5knob : recombinant his tagged knob protein of Adenovirus 5

HIV : human immunodeficiency virus

HRP : horseradish peroxidase

IPTG : isopropylthio- β -galactoside

LPS : lipopolysaccharide

MHC : major histocompatibility complex

NCTXA : cholera toxin subunit A

OVA : ovalbumin

PBS : phosphate buffered saline

PVDF : polyvinylidene fluoride

SDS : sodium dodecyl sulfate

SDS-PAGE : sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis

Tat : trans-acting activator of transcription

TBS-T : tris buffered saline with tween 20

TJ : tight junction

TMB : 3, 3', 5, 5'-tetramethylbenzidine

【本論文内容の誌上発表】

Kano J, Koizumi N, Terada A, Matsuoka A, Hirai T, Nomura T, Mizuguchi H, and Utoguchi N. Fiber-knob region of adenovirus type 5 vector promotes migration of A549 cells. *BPB reports*, **Vol.4 No.1**, 17-21(2021).