

ファイバーミュータントアデノウイルスベクターを用いた
樹状細胞への効率的な遺伝子導入

岡田直貴

京都薬科大学薬剤学教室, 〒607-8414 京都市山科区御陵中内町 5

Efficient Gene Delivery into Dendritic Cells by
Fiber-Mutant Adenovirus Vectors

Naoki OKADA

Department of Biopharmaceutics, Kyoto Pharmaceutical University,
5 Nakauchi-cho, Misasagi, Yamashina-ku, Kyoto 607-8414, Japan

(Received April 16, 2001)

Dendritic cells (DC) are professional antigen-presenting cells with a key function in the immune system as initiators of T-cell responses against microbial pathogens and tumors. Therefore, the immunization using DC loaded with tumor-associated antigens is potential to represent a powerful method of inducing anti-tumor immunity. Recent studies have demonstrated the usefulness of DC genetically modified by adenovirus vectors (Ad) to immunotherapy, while sufficient gene transduction into DC is required for high doses of Ad. Entry of Ad into target cells occurs by serial two steps: the binding of Ad-fiber knob to Coxsackie-adenovirus receptor (CAR) on the cell surface, and the subsequent interaction between Arg-Gly-Asp (RGD) motif located in Ad-penton base and α_v -integrins. The reverse transcription-polymerase chain reaction analysis revealed that the relative resistance of DC to Ad-mediated gene transfer was due to the absence of CAR expression, and that DC expressed adequate α_v -integrins. Therefore, we investigated whether fiber-mutant Ad (FM-Ad) containing the RGD sequence in the fiber knob can efficiently transduce and express high levels of the foreign gene into DC. The gene delivery by FM-Ad was more efficient than that by conventional Ad in both murine DC lines and normal human DC. Furthermore, both antigen presentations via major histocompatibility complex class I molecules and *in vivo* antigen-specific cytotoxic T lymphocyte induction by DC transduced with antigen gene by FM-Ad were superior to those by DC applied with conventional Ad. We propose that α_v -integrin-targeted FM-Ad is a very powerful tool to implement DC-based vaccination strategies.

Key words—adenovirus vector; dendritic cell; gene-immunotherapy

はじめに

ワクチン開発における重要な検討課題として、より有効な免疫応答を惹起できる抗原デリバリー法の開発が挙げられる。近年の免疫学及び分子生物学の著しい発展に伴い、免疫系を構成する細胞あるいは機能分子の生物学的特性が急速に解明されてきており、免疫系の司令塔とも言うべき樹状細胞 (dendritic cell; DC) が抗原デリバリーのためのキャリアーとして注目されている。骨髄幹細胞に由来する DC は、未熟な状態で生体内に広く分布しており、旺盛な抗原貪食能を有している。抗原を細胞内に取り込んだ DC は成熟し、細胞表面に主要組織適合遺伝子複合体 (major histocompatibility complex; MHC) 分子、共刺激分子といった抗原提示に必要

な機能分子の発現を高めるとともに、取り込んだ抗原を MHC class I 及び class II 分子とともに細胞表面に提示可能なペプチドにまでプロセッシングする。さらに、輸入リンパ管や血管を介して最寄りのリンパ組織へと遊走し、リンパ組織に存在するナイーブ T 細胞へ抗原提示することにより、抗原特異的 T 細胞依存性の初期免疫応答を惹起する¹⁾ (Fig. 1)。現在、このような DC の免疫学的機能を利用した DC-based immunotherapy が、腫瘍特異抗原分子を標的とした癌の免疫学的抑圧に向けて精力的に研究されており、とりわけ腫瘍関連抗原 (tumor-associated antigen; TAA) ペプチドをパルスした DC による癌免疫療法に関しては既に臨床試験として進行しつつある。²⁻⁴⁾

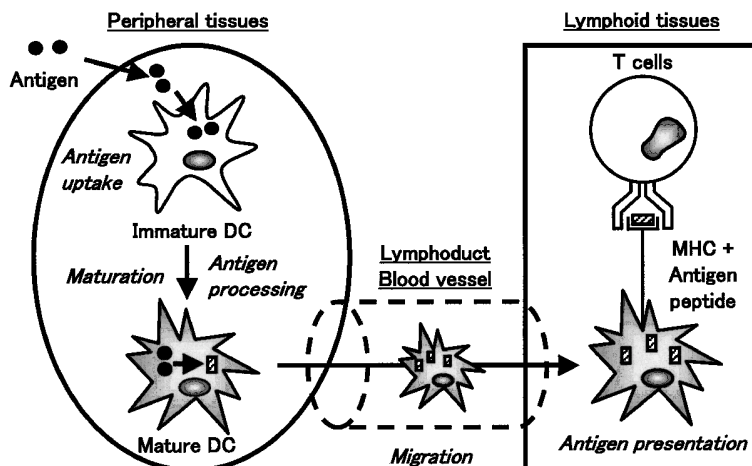


Fig. 1. Control of T Cell-Dependent Immunity by DC

Antigens are captured by immature DC in peripheral tissues and processed to form MHC-peptide complexes. As a consequence of antigen deposition and inflammation, DC begin to mature, expressing large amounts of MHC-peptides complexes on their surface. Additionally, they up-regulate co-stimulatory molecules and migrate to regional lymphoid tissues where they prime and activate antigen-specific T cells.

しかしながら、TAA ペプチドをパルスした DC の抗原提示機能は、TAA ペプチドと MHC 分子の結合アフィニティーが低い、あるいは MHC 分子のターンオーバーにより TAA ペプチドが MHC 分子と解離してしまうことにより、一過性であることが報告されている。⁹⁾ さらに、TAA ペプチドをパルスした DC による癌免疫療法は、患者の MHC ハプロタイプに適合する TAA ペプチドエピトープを同定することが不可欠であり、その適用において大きな制限を受けることになる。これらの問題点を解決するために、最近、DC に TAA をコードする遺伝子を導入することによって、DC への持続的な抗原供給を行うとともに、DC 内に full-length の TAA を発現させることで未同定の抗原エピトープをも DC に提示させようという試みが注目されている。

近年、種々の遺伝子導入法が開発されており、なかでもアデノウイルスベクター (Ad) は、増殖期・静止期の如何を問わず広範な種類の細胞・組織に効率よく遺伝子導入可能であることから、^{6,7)} 遺伝子治療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。DC への遺伝子導入においても、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・発現効率に優れたベクターである。⁸⁾ しかしながら、DC は他の細胞種と比較して、Ad による遺伝子導入に比較的抵抗性を示すことが知られており、十分な遺伝子発現を達成するには高用量のウイ

ルス粒子を必要とするため、Ad による DC への細胞毒性 (cytopathic effect) を発現する可能性が高い。したがって、より少量の適用で DC への十分な遺伝子発現が達成できる Ad の開発が、DC-based gene immunotherapy の分野において急務とされている。

そこで本稿では、DC が Ad 遺伝子導入に対して抵抗性を示す原因を探索し、その結果に基づいて作製したファイバーミュータント Ad (FM-Ad) が、従来型 Ad と比較して DC への遺伝子導入・発現効率において非常に優れること、さらには FM-Ad により抗原遺伝子を導入した DC が強力な抗原特異的免疫応答を誘導できることを見出した研究結果について紹介する。

1. DC における CAR, α_v インテグリン, β_3 インテグリン, β_5 インテグリンの発現

Ad による標的細胞への遺伝子導入機序を Fig. 2 に示す。Ad は 252 個のカプソメアからなる正 20 面体構造をしており、12 個の頂点にはペントン (ファイバーとペントンベースからなる) と呼ばれる突起構造が存在する。Ad の標的細胞内への侵入は、まずファイバーが細胞表面上の Coxsackie-adenovirus receptor (CAR) に結合し、⁹⁾ 続いてペントンベースに存在する Arg-Gly-Asp (RGD) モチーフが接着分子である $\alpha_v\beta_3$ インテグリンあるいは $\alpha_v\beta_5$ インテグリンに結合する、¹⁰⁾ 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

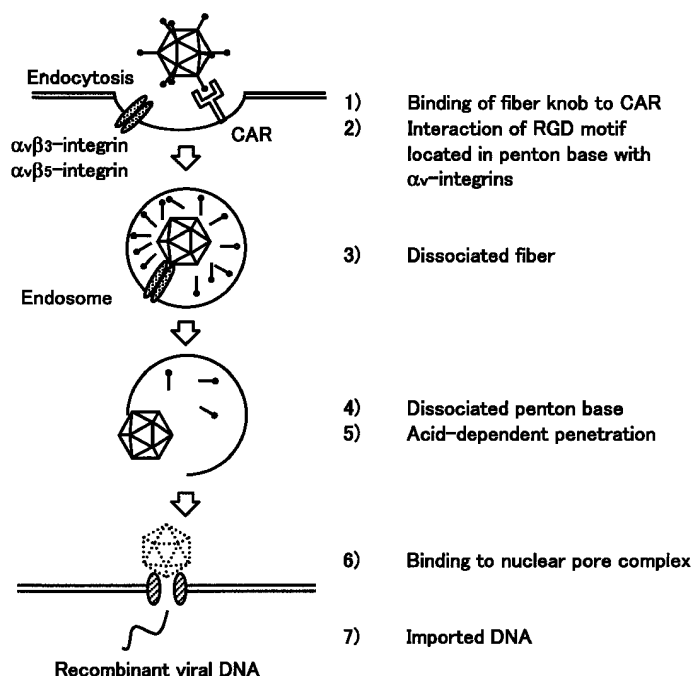


Fig. 2. Schematic Gene Transduction Mechanism of Ad

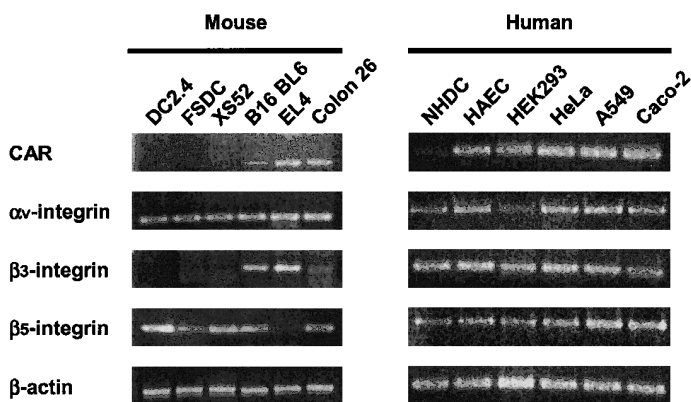


Fig. 3. RT-PCR Analysis of CAR, α_v -Integrin, β_3 -Integrin, and β_5 -Integrin in Murine and Human DC

Total RNA was prepared from 3 murine DC lines (DC2.4, FSDC and XS52), 3 murine tumor cell lines, normal human DC (NHDC), human aortic endothelial cells (HAEC) and 4 human cell lines, and then RT-PCR was performed. To control the quality of the procedure, RT-PCR was performed on the samples using specific primers for β -actin.

ドソームに達した Ad は、酸性条件下でカプシド蛋白質の構造変化を起こし、エンドソームを破壊して細胞質内へと侵入する。その後、Ad は核膜孔に結合し、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。筆者らは、この一連の機構に鑑み、DC の Ad 遺伝子導入に対する抵抗性が、Ad の細胞内侵入に必要とされる CAR あるいはインテグリンの低発現に起因するのではないかと予想した。

そこで、マウス DC line である DC2.4 細胞,¹¹⁾

FSDC 細胞,¹²⁾ XS52 細胞,¹³⁾ 及びヒト正常 DC である NHDC 細胞について、CAR, α_v インテグリン, β_3 インテグリン, β_5 インテグリンの mRNA 発現レベルを reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) 解析により確認した (Fig. 3)。その結果、いずれのマウス DC line にも、CAR mRNA の発現は検出されず、Ad との最初の結合に必要な CAR を細胞表面に発現していないことが示された。一方、Ad 遺伝子導入における二番目のレセプターとして機能する α_v インテグリン及び β_5 イ

ンテグリンの mRNA 発現は十分に認められたことから、これら DC line 表面には $\alpha_v\beta_3$ インテグリンのヘテロダイマーが存在することが強く示唆された。¹⁴⁾ 同様に、NHDC 細胞についても、CAR mRNA の発現はヒト大動脈由来血管内皮細胞 (HAEC) 及び 4 種のヒト腫瘍細胞と比較して極めて低く、一方で、NHDC 細胞には $\alpha_v\beta_3$ 及び $\alpha_v\beta_5$ インテグリンが十分に発現していることが判明した。¹⁴⁾

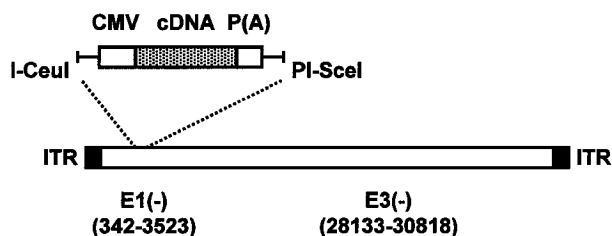
これらの結果から、Ad 遺伝子導入に対する DC の抵抗性が、DC における CAR の低発現あるいは欠損によるものであり、Ad の標的指向性を改変する (細胞への最初の結合が CAR に依存しない) ことにより、DC への効率的な遺伝子導入を達成できる可能性が示された。

2. FM-Ad の構築

本研究に用いた非増殖性 Ad は、E1 及び E3 領域を欠損させたアデノウイルス type 5 をもとに、共同研究者である水口裕之博士 (国立医薬品食品衛生研究所) らの開発した improved in vitro ligation method^{15,16)} に従って作製した。本法は、Ad ゲノムの E1 欠損領域に 3 つのユニークな制限酵素サイトを

を挿入することにより、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 Ad ゲノムへの目的遺伝子の組み込みを可能とし、従来の相同組換えを利用した Ad 作製法と比較して、極めて簡便にかつ高い効率で新規 Ad を構築できる画期的な方法である。Figure 4 に今回作製した Ad のコンストラクトを示す。従来型 Ad である、Ad-LacZ 及び Ad-OVA は、サイトメガロウイルスプロモーターの制御下に大腸菌 β -galactosidase (β -gal) をコードする LacZ cDNA あるいはニワトリ卵白アルブミン (OVA) cDNA をそれぞれ組み込んだ Ad である。また、Ad-RGD-LacZ 及び Ad-RGD-OVA はそれぞれ対応する従来型 Ad と同一の発現カセットを持ち、さらにファイバーの HI loop 領域に RGD 配列に相当するオリゴヌクレオチドを組み込んだ FM-Ad である。ファイバー領域の遺伝子改変は水口博士の開発した two-step method¹⁷⁾ に準拠して行った。この遺伝子改変についても、HI loop 領域にユニークな制限酵素サイト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よく挿入することが可能である。作製した Ad は HEK293 細胞内で増殖させ、塩化セシ

Conventional Ad (Ad-LacZ and Ad-OVA)



Fiber-mutant Ad (Ad-RGD-LacZ and Ad-RGD-OVA)

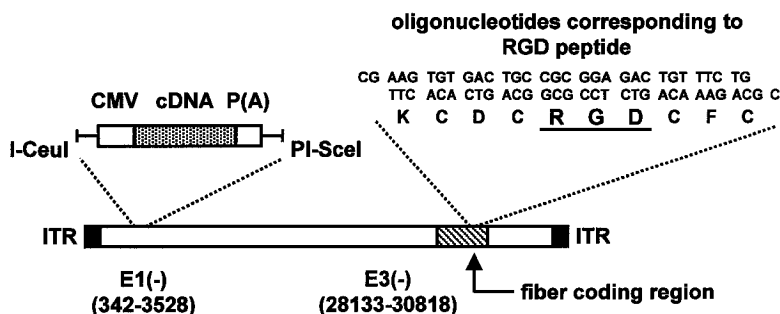


Fig. 4. Schematic Representation of Ad

Construction procedure of Ad-LacZ, Ad-OVA, Ad-RGD-LacZ and Ad-RGD-OVA has been reported.¹⁴⁻¹⁷⁾ ITR: inverted terminal repeat, CMV: cytomegalovirus promoter, P(A): bovine growth hormone polyadenylation signal.

ウム密度勾配遠心にて精製し、Ad 粒子数の測定は Maizel らの方法に従った。¹⁸⁾

3. DC への遺伝子導入・発現効率

マウス DC line に、Ad-LacZ あるいは Ad-RGD-LacZ を種々の粒子数で 1.5 時間感染させ、2 日後に細胞内 β -gal 活性を chemiluminescent β -gal assay にて評価した (Fig. 5)。1000 vector particles/cell の Ad-RGD-LacZ を感染させた DC2.4 細胞及び XS52 細胞には、4000 vector particles/cell の Ad-LacZ を感染させた場合に相当する β -gal 活性が検出された。すなわち、ファイバー領域に RGD 配列を挿入することにより、細胞への結合において α_v インテグリン指向性を付加した FM-Ad は、マウス DC における遺伝子発現効率を従来型 Ad の約 4 倍に向上できることが判明した。¹⁴⁾ さらに、ヒト NHDC 細胞に関しても Ad-LacZ 及び Ad-RGD-LacZ による遺伝子導入効率・遺伝子発現効率をそれぞれ比較した。X-gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactopyranoside) 染色の結果、8000 particles/cell で Ad-RGD-LacZ を感染させた NHDC 細胞では、80% 以上の細胞において LacZ 遺伝子の導入が確認されたのに対し、同用量の Ad-LacZ を感染させた場合には、わずか 10% 程度の細胞が染色されたに過ぎなかった (Fig. 6A and B)。また、Ad-RGD-LacZ を感染させた NHDC 細胞の β -gal 活性は Ad 用量依存的に増大し、8000 vector particles/cell においては Ad-LacZ を感染させた場合と比較して 70 倍もの高い β -gal 活性が検出された (Fig. 6C)。以上の

結果から、ファイバーに RGD 配列を挿入した FM-Ad は、その遺伝子導入機序における標的細胞との最初の結合において α_v インテグリンをターゲットとすることにより、CAR 低発現あるいは欠損の DC に対して極めて効率の高い遺伝子導入・発現を達成できることが判明した。¹⁴⁾

4. FM-Ad により抗原遺伝子を導入した DC による抗原特異的免疫誘導

癌免疫療法では癌抗原特異的な抗体産生の増強を主体とする液性免疫系の活性化ばかりでなく、むしろ癌抗原特異的な細胞傷害性 T 細胞 (cytotoxic T lymphocyte; CTL) の誘導を中心とした細胞性免疫系の活性化が、有効な治療効果を得る上で重要である。CTL の活性化には DC による抗原提示が MHC class I 分子を介して為される必要があることから、FM-Ad 及び従来型 Ad により OVA 遺伝子を導入した DC2.4 細胞における MHC class I 抗原提示能を、OVA ペプチド-MHC class I 分子複合体を認識して IL-2 を分泌することが知られている CD8-OVA 1.3 細胞を用いて比較検討した (Fig. 7)。Ad-RGD-OVA 感染後 2 日間培養した DC2.4 細胞においては、Ad 粒子数依存的に MHC class I 抗原提示量が増大し、4000 vector particles/cell においては従来型 Ad を感染させた DC2.4 細胞と比較して約 10 倍の高値を示した (投稿準備中)。この結果は、Fig. 5 で示した DC2.4 細胞への遺伝子導入・発現効率における FM-Ad の優位性と良く相関しており、細胞内での OVA 発現量が MHC class I 抗原

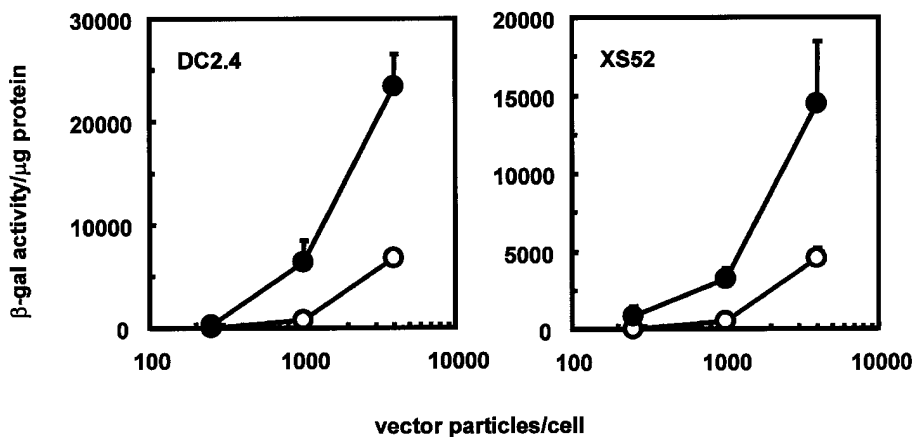


Fig. 5. Comparison of β -Gal Activity in Murine DC Lines Transduced with Ad-LacZ and Ad-RGD-LacZ

DC lines were transduced with Ad-LacZ (○) or Ad-RGD-LacZ (●) at 250, 1000, or 4000 vector particles/cell for 1.5 h. Two days later, β -gal activity was measured using a chemiluminescent β -gal assay. All data are presented as means \pm SE of three experiments.

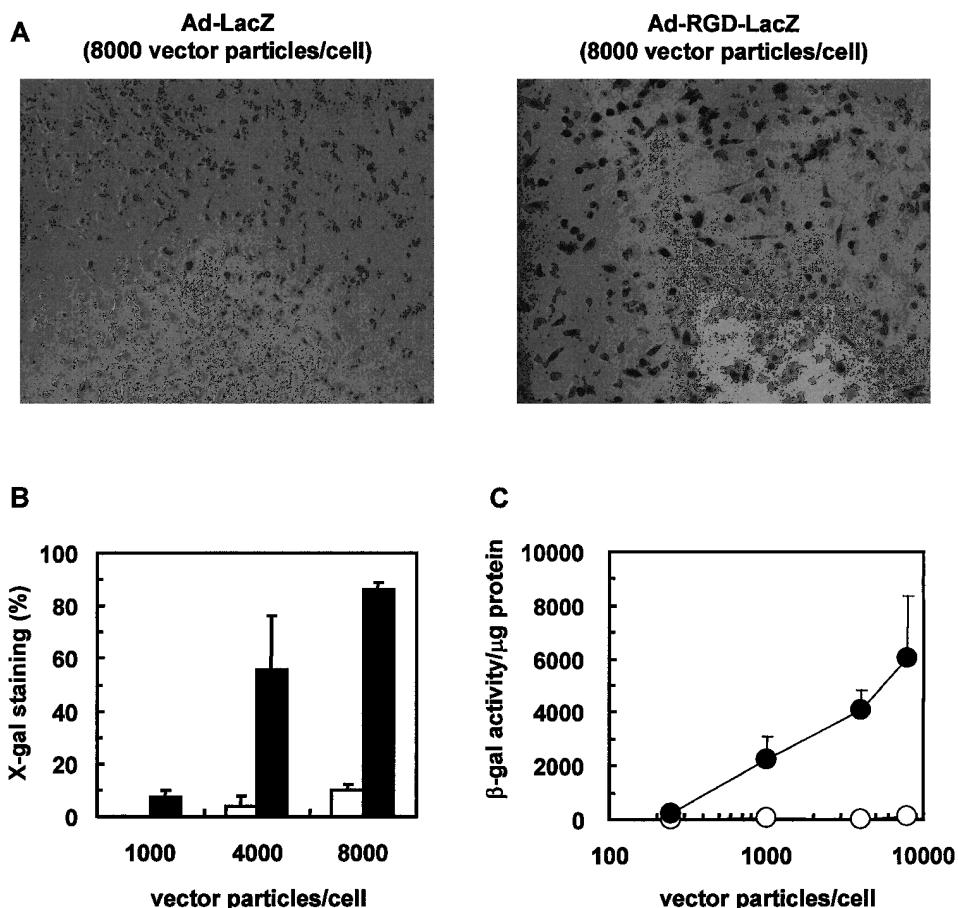


Fig. 6. The Ability of Ad-RGD-LacZ to Transfer and Express LacZ Genes into NHDC

NHDC were infected with Ad-LacZ or Ad-RGD-LacZ for 1.5 h. After 2 days of culture at 37°C, the cells were washed, fixed, and stained with X-gal to detect LacZ expression, and cells were observed under phase-contrast microscopy. (A): X-gal staining of NHDC infected with 8000 vector particles/cells of Ad-LacZ (left) or Ad-RGD-LacZ (right). (B): LacZ gene-transduction of NHDC infected with indicated vector particles/cell of Ad-LacZ (open column) or Ad-RGD-LacZ (closed column) was expressed as X-gal staining (%) calculated using the following formula: X-gal staining (%) = (number of X-gal staining cells per field) / (number of total cells per field) \times 100. Data are presented as means \pm SD of 5 fields. (C): NHDC were infected with indicated vector particles/cell of Ad-LacZ (\circ) or Ad-RGD-LacZ (\bullet) for 1.5 h. Two days later, β -gal activity was measured by chemiluminescent β -gal assay. Data are presented as means \pm SE of three experiments.

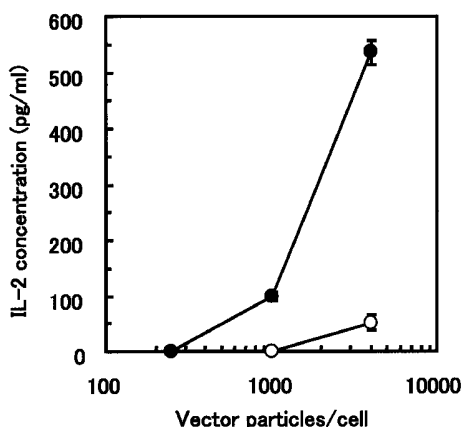


Fig. 7. Antigen Presentation on MHC Class I Molecules by DC2.4 Cells Infected with Ad-OVA and Ad-RGD-OVA

DC2.4 cells were transduced with Ad-OVA (\circ) or Ad-RGD-OVA (\bullet) at 250, 1000, or 4000 vector particles/cell for 1.5 h. Two days later, cells were co-cultured with specific T-T hybridoma against OVA⁺ H-2K^b, CD8-OVA 1.3 cells, at 37°C for 20 h. The response of stimulated CD8-OVA 1.3 cells was assessed by determining IL-2 released into an aliquot of culture medium using murine IL-2 ELISA. Each point represents the mean \pm SE of three independent cultures.

提示量に反映されたものと考えられた。

そこで次に、4000 vector particles/cell の Ad-RGD-OVA 及び Ad-OVA を感染させた DC2.4 細胞を、マウスに皮内免疫 (1×10^6 cells/mouse) することで誘導される OVA 特異的 CTL 応答を比較した (Fig. 8)。免疫 7 日後のマウスから回収した脾細胞を *in vitro* 抗原再刺激することによりエフェクター細胞を調製し、europium (Eu) release assay を行ったところ、OVA トランスフェクタントである E.G7-OVA 細胞をターゲット細胞とした際には、Ad-OVA 感染 DC2.4 細胞免疫群と比較して、Ad-RGD-OVA 感染 DC2.4 細胞免疫群においてより強力なターゲット細胞の傷害が認められた。一方、Ad-RGD-LacZ (コントロールベクター) 感染 DC2.4 細胞あるいは intact DC2.4 細胞を免疫した群では E.G7-OVA 細胞の傷害は認められず、また、

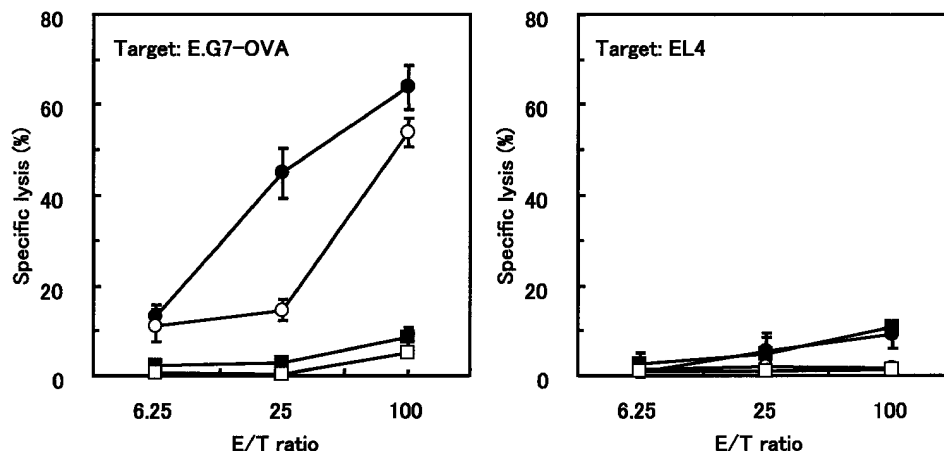


Fig. 8. OVA-Specific CTL Responses in Mice Immunized with Ad-OVA-Infected or Ad-RGD-OVA-Infected DC2.4 Cells

C57BL/6 mice were immunized by intradermal injection with 1×10^6 DC2.4 cells transduced by Ad-OVA (○), Ad-RGD-OVA (●) or Ad-RGD-LacZ (■) at 4000 vector particles/cell. Similarly, intact DC2.4 cells (□) were injected into mice intradermally. One week later, mice were sacrificed, their spleens removed and splenocytes were prepared. After *in vitro* restimulation with E.G7-OVA cells for 5 days, effector cells were incubated with Eu-labeled target cells (E.G7-OVA cells or EL4 cells) at 37°C for 4 h. The specific lysis of target cells was determined by using the following formula; Specific lysis (%) = [(experimental Eu-release) - (spontaneous Eu-release)] / [(maximum Eu-release) - (spontaneous Eu-release)] × 100. Spontaneous release in the absence of effector cells was <10% of maximum release by detergent. Each point represents the mean ± SE of 3–5 mice.

OVA ペプチドを MHC class I 分子上に提示していない EL4 細胞をターゲット細胞とした際には、どの群にも細胞傷害性は検出されなかった。以上の結果から、FM-Ad により抗原遺伝子を効率よく導入された DC は、高い MHC class I 抗原提示を伴って、*in vivo* において抗原特異的 CTL をより効果的に誘導できることが示された（投稿準備中）。したがって、DC-based gene immunotherapy の臨床応用を想定した場合、癌患者末梢血より採取・分化誘導できる数少ない DC を有効に利用し、より効果的な免疫応答を惹起する観点から、本研究で使用した FM-Ad は非常に有用性の高いベクターシステムであると考えている。

おわりに

現在、抗原遺伝子あるいはサイトカイン遺伝子を導入した DC による細胞免疫療法が精力的に研究されており、様々なマウス腫瘍モデルにおいて強力な抗腫瘍効果が報告されている。^{19–22} DC への遺伝子導入には、他の方法と比較して導入効率に優れる点から Ad が一般的に用いられているが、⁸⁾ 十分な遺伝子発現を得るためには高用量の Ad が必要とされ、Ad による DC の細胞傷害性が新たな問題点としてクローズアップされてきた。近年、bispecific 抗体²³⁾やカチオニックリポソーム²⁴⁾を併用することによって、Ad による DC への遺伝子導入効率を向上させようという試みがなされているが、これらのア

プローチは汎用されるまでには至っていない。その最大の理由として、相同組換えを利用した従来の Ad 作製法では、任意の目的遺伝子を組み込んだ新規 Ad の作製が困難であることが挙げられる。今回、筆者らが使用したファイバーミュータント Ad システムは、DC への遺伝子導入効率を向上させるばかりでなく、前述のとおり、Ad への目的遺伝子の組み込みとファイバー領域の遺伝子改変が、プラスミド構築等で一般的に行われている ligation method を用いるだけで、簡便にかつ短期間で行うことができるという利点を有している。^{15–17)} 今後、本システムを用いて抗原遺伝子あるいはサイトカイン遺伝子を導入した DC の免疫学的機能に関する詳細な検討を進めることにより、高い治療効果の期待できる安全な細胞免疫療法の確立を目指していく予定である。

謝辞 本総説で紹介した研究成果は、京都薬科大学薬剤学教室において得られたものであり、ご指導とご助言を賜りました山本 昌教授、藤田卓也助教授並びに実験にご協力をいただきました同教室の諸氏に厚く御礼申し上げます。また、共同研究としてご指導・ご助言さらに多大なるご支援を賜りました大阪大学大学院薬学研究科薬剤学分野、真弓忠範教授、中川晋作助教授、堤 康央助手及び同研究室の諸氏、並びに国立医薬品食品衛生研究所生物薬品

部, 早川堯夫部長, 水口裕之研究員に心より感謝申し上げます。さらに, DC2.4 細胞をご供与いただいた Dr. Kenneth L. Rock (Department of Pathology, University of Massachusetts Medical School), FSDC 細胞をご供与いただいた Dr. Paola Ricciardi-Castagnoli (Department of Biotechnology and Bioscience, University of Milano-Bicocca), XS52 細胞をご供与いただいた Dr. Akira Takashima (Department of Dermatology, University of Texas Southwestern Medical Center) に深謝いたします。

なお, 本研究の一部は文部科学省科学研究費補助金, 私立大学等経常費補助金特別補助 (高度化の推進), 文部科学省学術フロンティア推進事業, 文部科学省バイオ・ベンチャー研究開発拠点整備事業の援助のもとに行われたことを記して感謝申し上げます。

REFERENCES

- 1) Banchereau J., Steinman R. M., *Nature*, **392**, 245–252 (1998).
- 2) Mayordomo J. I., Zorina T., Storkus W. J., Zitvogel L., Celluzzi C., Falo L. D., Melief C. J., Ildstad S. T., Kast W. M., Deleo A. B., Lotze M. T., *Nat. Med.*, **1**, 1297–1302 (1995).
- 3) Hsu F. J., Benike C., Fagnoni F., Liles T. M., Czerwinski D., Taidi B., Engleman E. G., Levy R., *Nat. Med.*, **2**, 52–58 (1996).
- 4) Nestle F. O., Alijagic S., Gilliet M., Sun Y., Grabbe S., Dummer R., Burg G., Schadendorf D., *Nat. Med.*, **4**, 328–332 (1998).
- 5) Germain R. N., Margulies D. H., *Annu. Rev. Immunol.*, **11**, 403–450 (1993).
- 6) Kay M. A., Woo S. L., *Trends Genet.*, **19**, 253–257 (1994).
- 7) Kozarsky K. F., Wilson J. M., *Curr. Opin. Genet. Dev.*, **3**, 499–503 (1993).
- 8) Arthur J. F., Butterfield L. H., Roth M. D., Bui L. A., Kiertscher S. M., Lau R., Dubinett S., Glaspy J., McBride W. H., Economou J. S., *Cancer Gene Ther.*, **4**, 17–25 (1997).
- 9) Bergelson J. M., Cunningham J. A., Droguett G., Kurt-Jones E. A., Krithivas A., Hong J. S., Horwitz M. S., Crowell R. L., Finberg R. W., *Science*, **275**, 1320–1323 (1997).
- 10) Wickham T. J., Mathias P., Cheres D. A., Nemerow G. R., *Cell*, **73**, 309–319 (1993).
- 11) Shen Z., Reznikoff G., Dranoff G., Rock K. L., *J. Immunol.*, **158**, 2723–2730 (1997).
- 12) Girolomoni G., Lutz M. B., Pastore S., Assmann C. U., Cavani A., Ricciardi-Castagnoli P., *Eur. J. Immunol.*, **25**, 2163–2169 (1995).
- 13) Xu S., Ariizumi K., Caceres-Dittmar G., Edelbaum D., Hashimoto K., Bergstresser P. R., Takashima A., *J. Immunol.*, **154**, 2697–2705 (1995).
- 14) Okada N., Tsukada Y., Nakagawa S., Mizuguchi H., Mori K., Saito T., Fujita T., Yamamoto A., Hayakawa T., Mayumi T., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **282**, 173–179 (2001).
- 15) Mizuguchi H., Kay M. A., *Hum. Gene Ther.*, **9**, 2577–2583 (1998).
- 16) Mizuguchi H., Kay M. A., *Hum. Gene Ther.*, **10**, 2013–2017 (1999).
- 17) Mizuguchi H., Koizumi N., Hosono T., Utoguchi N., Watanabe Y., Kay M. A., Hayakawa T., *Gene Ther.*, in press (2001).
- 18) Maizel Jr. J. V., White D. O., Scharff M. D., *Virology*, **36**, 115–125 (1968).
- 19) Wan Y., Bramson J., Carter R., Graham F., Gaudie J., *Hum. Gene Ther.*, **8**, 1355–1363 (1997).
- 20) Song W., Kong H. L., Carpenter H., Torii H., Granstein R., Rafii S., Moore M. A., Crystal R. G., *J. Exp. Med.*, **186**, 1247–1256 (1997).
- 21) Melero I., Duarte M., Ruiz J., Sangro B., Galofre J., Mazzolini G., Bustos M., Qian C., Prieto J., *Gene Ther.*, **6**, 1779–1784 (1999).
- 22) Miller P. W., Sharma S., Stolina M., Butterfield L. H., Luo J., Lin Y., Dohadwala M., Batra R. K., Wu L., Economou J. S., Dubinett S. M., *Hum. Gene Ther.*, **11**, 53–65 (2000).
- 23) Tillman B. W., de Gruijl T. D., Luykx-de Bakker S. A., Scheper R. J., Pinedo H. M., Curiel T. J., Gerritsen W. R., Curiel D. T., *J. Immunol.*, **162**, 6378–6383 (1999).
- 24) Dietz A. B., Vuk-Pavlovic S., *Blood*, **91**, 392–398 (1998).