

し、この CD3 陽性 T 細胞の腫瘍内浸潤は、腫瘍増殖抑制が認められなかった CX3CL1 発現 OV-HM 細胞移植群でも認められた。

そこで、両者の違いを明らかにすべく、その浸潤像を詳細に観察した結果、CX3CL1 発現 OV-HM 細胞移植群では CD3 陽性 T 細胞が血管周辺にほとんど局在していたのに対して、CCL27 発現 OV-HM 細胞移植群では腫瘍深部にまで浸潤が認められた。T 細胞の細胞傷害メカニズムから考えると、腫瘍細胞が T 細胞によって傷害されるためには T 細胞が腫瘍細胞に直接接触しなければならない。しかし、CX3CL1 発現 OV-HM 細胞移植群では T 細胞は腫瘍血管周辺に局在しており、腫瘍細胞と直接接触している割合が低かった。そのため腫瘍細胞が傷害されず、腫瘍の増殖を完全に抑制できなかったものと考えられる。

もう一つの違いとしては、CX3CL1 発現 OV-HM 細胞移植群ではコントロール群と比較して血管が発達していたことである。腫瘍においては一般に腫瘍の増殖と免疫反応による傷害が同時に繰り広げられ、腫瘍の増殖退縮の成否はまさにそのバランスによって規定される。血管新生は腫瘍の増殖に必須の現象であり、CX3CL1 は *in vivo* において血管新生促進作用が報告された¹⁷⁾。この事実を考え合わせると、CCL27 と CX3CL1 の抗腫瘍効果の違いは血管新生に与える影響による差であるという可能性も考えられる。

サイトカイン・ケモカイン併用投与によるがん免疫療法の最適化

腫瘍細胞に CCL27 を発現させることにより、がんのエフェクター細胞である T 細胞を腫瘍深部にまで浸潤させることが出来たことから、CCL27 発現 Ad-RGD (Ad-RGD-CCL27) を用いてがん治療実験を行った。まず、OV-HM 担がんマウスの腫瘍内に Ad-RGD-CCL27 を投与したが、顕著な腫瘍増殖抑制は認められなかった。本結果は、すでに生着している腫瘍に対しては、たんに腫瘍内に T 細胞を浸潤させるだけでは十分な抗腫瘍効果が得られないことを示すものである。

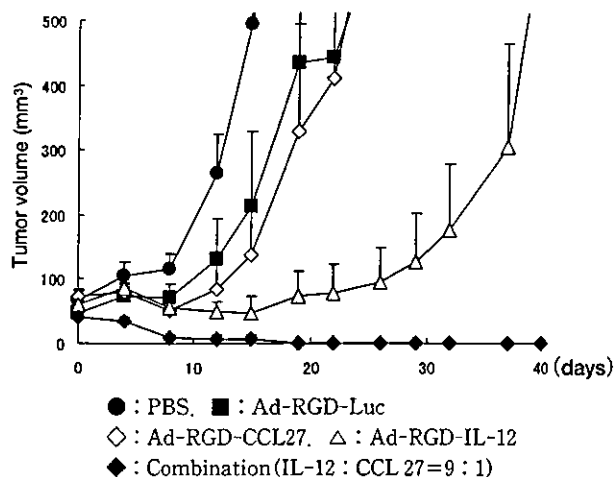


図 3 Synergistic anti-tumor effect of Ad-RGD-IL-12 and Ad-RGD-CCL27

B6C3F1 mice were inoculated intradermally with OV-HM cells (1×10^6 cells/mouse). Groups of mice bearing OV-HM tumor nodules inoculated about one week before treatment onset were intratumorally injected with the indicated adenoviruses (in total is 2×10^7 PFU) or PBS. Ad-RGD-Luc was used as negative control. Tumor size was measured twice a week using caliper.

そこで、免疫系細胞を活性化させるサイトカインとして IL-12 を選択し、CCL27 との併用によるがん免疫療法の最適化を試みた¹⁸⁾。その結果、IL-12 発現 Ad-RGD (Ad-RGD-IL-12) 単独投与群 (2×10^7 PFU/mouse) では、腫瘍の増殖が抑制され、7 例中 4 例の完全治癒が得られた。一方、Ad-RGD-IL-12 と Ad-RGD-CCL27 を 9:1 の割合で混合して投与した群では、総投与量が等量 (2×10^7 PFU/mouse) であるにもかかわらず、腫瘍の増殖は完全に抑制され、8 例中全例が完全治癒した (図 3)。この抗腫瘍効果の機構解明を目的にヌードマウスを用いて同様に検討したところ、併用投与群においても抗腫瘍効果は観察されなかった。さらに、CD4、CD8 陽性 T 細胞の両方を除去したマウスでは、コントロール群と同程度以上の腫瘍の増殖が観察された。これらの結果から、今回得られた抗腫瘍効果には、T 細胞が重要な働きをしていることが明らかとなった。

つづいて、腫瘍組織内への T 細胞の浸潤について検討を行ったところ、Ad-RGD-CCL27 単独投与群、および併用投与群において多くの T 細胞が腫瘍内へと浸潤していたことが明らかとなった。さらに、Ad-RGD-CCL27 単独投与群では、主に CD4 陽性 T

細胞が多く浸潤しており、CD8 陽性 T 細胞の浸潤は Ad-RGD-IL-12 単独投与群よりも少なかった。しかし、併用投与群では CD4 陽性 T 細胞のみならず CD8 陽性 T 細胞もともに浸潤していることが明らかとなった。

本結果は、IL-12 によるリンパ球の活性化と CCL27 によるそれら細胞の浸潤という両者を組み合わせることにより、効果的な治療効果が得られることを示したものであり、今後のがん免疫療法において cell delivery system の概念に基づいたアプローチが重要であることを示すものである。

ケモカインレセプターを用いたがん免疫療法

養子免疫療法や LAK 療法、DC ワクチン療法においては、T 細胞や DC などを患者の体内から取り出し、*in vitro* でサイトカインや抗原などで刺激することで疾病治療に有効な機能性細胞へとつくり上げ、それを薬物として患者の体内へと戻すことによる治療である。

しかしながら、これら生きた細胞を薬物として投与しても、その生きた薬物が標的組織である腫瘍組織やリンパ節へ移行する割合がきわめて低いため、十分な治療効果が得られていないのが現状である。そのため効果的な抗腫瘍効果という薬効を発現させるために、少しでも多くの薬物としての細胞を投与しようと試みられている。これは、一般医薬品に置き換えて考えると、医薬品の生体内動態を改善しようとするのではなく、組織移行性に乏しいから大量投与しようとしているのと同じである。

筆者らは、この問題点を克服するにあたってケモカインが有用であると考えている。Huang らは、養子免疫療法として投与する CD8 陽性 T 細胞が発現しているケモカインレセプターを調べ、それに対応するケモカインを腫瘍内で発現させることで、投与細胞の腫瘍移行量が増加し、それに伴い強い抗腫瘍効果が得られることを報告している¹⁹⁾。

また、ケモカインは通常のリンパ球の体内動態制御に関わる分子であり、腫瘍組織においても種々ケモカインが発現していることから、薬物として投与する免疫細胞にそれらケモカインに対するレセプ

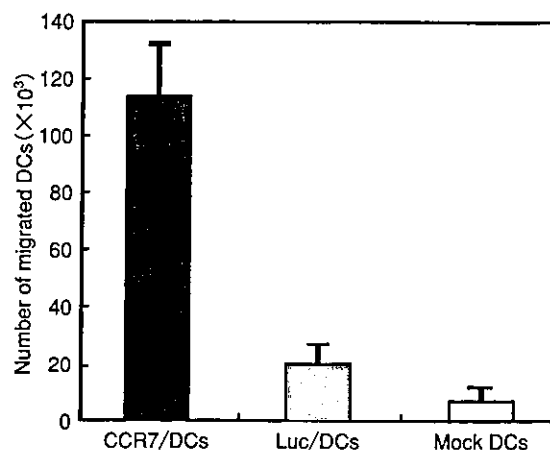


図 4 Migration of CCR7/DCs from administration site to draining lymph node

EGFP-Tg DCs were transduced with Ad-RGD-CCR7 or Ad-RGD-Luc at 50 MOI. These transduced cells and mock DCs were intradermally injected into the left flank of C57BL/6 mice at 2×10^5 cells. After 2 days, the draining lymph nodes were collected from these mice and stained by indirect immunofluorescence using anti-CD11c monoclonal antibody. The abundance of EGFP⁺ CD11c⁺ DCs were assessed by flow cytometric analysis.

ターを発現させれば、腫瘍組織への移行量が増大すると考えられる。これはケモカインレセプターによる免疫細胞の標的組織へのターゲティングであり、現在この点については、レンチウイルスベクターを用いて検討している。

一方筆者らは、DC ワクチン療法においてケモカインレセプターを利用することで、強い免疫反応を誘導することに成功している²⁰⁾。DC は、T 細胞を効率よく活性化しうる細胞であり、T 細胞依存性の獲得免疫応答の開始・増幅、さらには自然免疫応答の制御をも含めた免疫監視機構の司令塔として機能しているプロフェッショナル抗原提示細胞である。

現在行われている DC ワクチン療法は、末梢単核球や単球、骨髄細胞からサイトカイン刺激下で誘導した未成熟 DC に、がん抗原遺伝子や蛋白質を導入したものを患者に投与するというものである。しかしながら、生体に投与した DC が T 細胞を感作・活性化させる場である所属リンパ節へ遊走するのは、投与したうちの 1% 以下であるため、免疫エフェクター細胞の十分な感作・活性化が制限されてしまうという問題点が残されている。

こうしたなか、DC のリンパ組織移行に関する分

子メカニズムについて、炎症反応に伴って DC に発現誘導されるケモカインレセプター (CCR7) とリンパ組織で恒常的に産生される CCL21 との連関が中心的な役割を果たすことが近年判明した。したがって、薬物として投与する DC に充分に CCR7 を発現させることが出来れば、リンパ組織指向性の DC となり、ターゲティング能を兼ね備えた“生きた薬物”が創製できる可能性がある。

そこで、Ad-RGD を用いて CCR7 を高発現させた DC (CCR7/DCs) を調製し、そのリンパ組織集積性、ならびにワクチン機能について検討した。CCR7/DCs を皮内投与したときの体内動態について解析したところ、コントロールベクター処理 DC と比較して、5.5 倍も多くの DC が所属リンパ節へと送達できていることが明らかとなった (図 4)。すなわち、当初の目的どおり、DC に CCR7 を高発現させることによって、これまで問題となっていたリンパ組織移行性を大幅に改善できることが判明した。また、抗原を共導入した CCR7/DCs では、たんに抗原のみを導入した DC よりも少ない DC 数で効果的な抗腫瘍効果が得られることを確認した。

本結果は、細胞を標的組織であるリンパ節へと積極的に送達させたことによる治療効果の向上であり、まさに cell delivery system を実践したものであるといえる。

おわりに

20 世紀の DDS 研究は低分子有機化合物の体内動態を制御することによる薬物治療の最適化を目指したものであった。本稿では、これまでの低分子有機化合物のみならず、生きた細胞を薬物として捉え、その細胞の体内動態を制御することによるがん免疫療法の最適化を目指した筆者らの研究成果について紹介した。この最もインテリジェントな粒子である細胞を薬物として捉えた DDS は、cell delivery system という 21 世紀の新たな DDS の分野を切り拓くものであり、今後この cell delivery system の概念をもとに、がん免疫療法をはじめとする多くの疾病治療法が開発されることを期待している。

本稿で紹介させていただいた成果の一部は、京都薬科大学 山本 昌先生、岡田直貴先生との共同研究により得られたものであり、ここに御礼申し上げます。

文 献

- 1) Iwasaki M, Yu WG, Uekusa Y, Nakajima C, Yang YF et al. : Differential IL-12 responsiveness of T cells but not of NK cells from tumor-bearing mice in IL-12-responsive versus-unresponsive tumor models. *Int Immunol* 12 : 701-709, 2000.
- 2) Zlotnik A, Yoshie O : Chemokines : a new classification system and their role in immunity. *Immunity* 12 : 121-127, 2000.
- 3) Butcher EC : Leukocyte-endothelial cell recognition : three(or more)steps to specificity and diversity. *Cell* 67 : 1033-1036, 1991.
- 4) Springer TA : Traffic signals for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration : the multistep paradigm. *Cell* 76 : 301-314, 1994.
- 5) Butcher EC, Picker LJ : Lymphocyte homing and homeostasis. *Science* 272 : 60-66, 1996.
- 6) Yoshida R, Nagira M, Imai T, Baba M, Takagi S et al. : EB11-ligand chemokine (ELC) attracts a broad spectrum of lymphocytes : activated T cells strongly up-regulate CCR7 and efficiently migrate toward ELC. *Int Immunol* 10 : 901-910, 1998.
- 7) Fitzhugh DJ, Naik S, Caughman SW, Hwang ST : Cutting edge : C-C chemokine receptor 6 is essential for arrest of a subset of memory T cells on activated dermal microvascular endothelial cells under physiologic flow conditions *in vitro*. *J Immunol* 165 : 6677-6681, 2000.
- 8) Imai T, Nagira M, Takagi S, Kakizaki M, Nishimura M et al. : Selective recruitment of CCR4-bearing Th2 cells toward antigen-presenting cells by the CC chemokines thymus and activation-regulated chemokine and macrophage-derived chemokine. *Int Immunol* 11 : 81-88, 1999.
- 9) Reiss Y, Proudfoot AE, Power CA, Campbell JJ, Butcher EC : CC chemokine receptor (CCR) 4 and the CCR10 ligand cutaneous T cell-attracting chemokine (CTACK) in lymphocyte trafficking to inflamed skin. *J Exp Med* 194 : 1541-1547, 2001.
- 10) Hedrick JA, Saylor V, Figueroa D, Mizoue L, Xu Y et al. : Lymphotactin is produced by NK cells and attracts both NK cells and T cells *in vivo*. *J Immunol* 158 : 1533-1540, 1997.
- 11) Yoneda O, Imai T, Goda S, Inoue H, Yamauchi A et al. : Fractalkine-mediated endothelial cell injury by NK cells. *J Immunol* 164 : 4055-4062, 2000.
- 12) Gao JQ, Tsuda Y, Katayama K, Nakayama T, Hatanaka Y et al. : Antitumor effect by interleukin-11 receptor alpha-locus chemokine/CCL27, introduced into tumor cells through a recombinant adenovirus vector. *Cancer Res* 63 : 4420-4425, 2003.
- 13) Gao JQ, Sugita T, Kanagawa N, Iida K, Okada N et al. : Anti-tumor responses induced by chemokine CCL19 transfected into an ovarian carcinoma model via fiber-mutant adenovirus vector. (Submitted).
- 14) Okada N, Gao JQ, Sasaki A, Niwa M, Okada Y et al. : Anti-tumor activity of chemokine is affected by both kinds of tumors and the activation state of the host's immune system : implications for chemokine-based cancer immunotherapy. *Biochem Biophys Res Commun*

317 : 68-76, 2004.

- 15) Gao JQ, Alexandre LS, Tsuda Y, Katayama K, Eto Y et al. : Tumor-suppressive activities by chemokines introduced into OV-HM cells using fiber-mutant adenovirus vectors. *Pharmazie* 59 : 238-239, 2004.
- 16) Mizuguchi H, Koizumi N, Hosono T, Utoguchi N, Watanabe Y et al. : 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.
- 17) Volin MV, Woods JM, Amin MA, Connors MA, Harlow LA et al. : Fractalkine : a novel angiogenic chemokine in rheumatoid arthritis. *Am J Pathol* 159 : 1521-1530, 2001.
- 18) Gao JQ, Sugita T, Kanagawa N, Iida K, Motomura Y et al. : Combination with chemokine CCL27 and cytokine IL-12 encoding in fiber-mutant adenovirus vector induced synergistic anti-tumor effect on ovarian carcinoma : both accumulation and activation of immune cells are indispensable for tumor regression. (In preparation).
- 19) Huang H, Xiang J : Synergistic effect of lymphotactin and interferon gamma-inducible protein-10 transgene expression in T-cell localization and adoptive T-cell therapy of tumors. *Int J Cancer* 109 : 817-825, 2004.
- 20) Okada N, Mori N, Koretomo R, Okada Y, Nakayama T et al. : Augmentation of the migratory ability of DC-based vaccine into regional lymph nodes by efficient CCR 7 gene transduction. *Gene Ther*, (In press).

3 遺伝子医薬品の DDS

衛藤佑介^{*1}, 真弓忠範^{*2}, 中川晋作^{*3}

3.1 遺伝子導入ベクター

遺伝子治療の臨床研究が開始されてから約 15 年が経過し、すでに 4000 人以上の患者に対する治療が行われている。DNA の細胞内へのデリバリー技術は、ウイルスのゲノムに治療用遺伝子を組み込んで標的細胞に感染させるウイルスベクター法と、人工化合物を遺伝子キャリアーとして用いる非ウイルスベクター法に分類できる（遺伝子だけを投与する場合も非ウイルスベクター法に分類される）。一般に非ウイルス法は、免疫原性や毒性が低く、安全性に優れてはいるものの、治療効果を得るための遺伝子導入効率及び発現効率が低いといった課題が残されている。一方ウイルスベクター法は、ウイルスの持つ感染機構を利用しているため遺伝子の発現効率は高く、導入遺伝子の安定発現が期待でき、臨床においても幅広く検討されている。しかし、ベクターとして用いたウイルスの免疫原性に起因すると思われるショック死（米国、1999 年）や、染色体

表 1 代表的な遺伝子導入ベクターの長所と短所

ベクターの種類	長 所	短 所
アデノウイルスベクター	遺伝子発現効率・導入効率が高い 非分裂細胞へも遺伝子導入が可能	免疫原性が高い 遺伝子発現が一過性
レトロウイルスベクター	染色体に組み込まれることにより、 永続的な遺伝子発現が可能	ランダムな遺伝子導入による癌化の 危険性 非分裂細胞へは遺伝子導入できない
アデノ随伴ウイルスベクター	非分裂細胞へも遺伝子導入が可能 染色体に組み込まれることにより、 永続的な遺伝子発現が可能	挿入できる遺伝子サイズが小さい (約 4.5kb) 作製方法がやや煩雑
レンチウイルスベクター	非分裂細胞へも遺伝子導入が可能 染色体に組み込まれることにより、 永続的な遺伝子発現が可能	ランダムな遺伝子導入による癌化の 危険性 作製方法がやや煩雑
カチオニックリポソーム	免疫原性がない 作製が容易 導入する遺伝子の制約が少ない	遺伝子導入効率が低い 遺伝子発現が一過性
膜融合リポソーム	蛋白質や粒子等も細胞質内へ直接導 入が可能 安全性が高い	血中での安定性に乏しい 遺伝子発現が一過性

*1 Yusuke Eto 大阪大学大学院 薬学研究科 薬剤学分野

*2 Tadanori Mayumi 神戸学院大学大学院 薬学研究科 教授

*3 Shinsaku Nakagawa 大阪大学大学院 薬学研究科 薬剤学分野 助教授

への非特異的な遺伝子挿入が原因と考えられる白血病発症（フランス，2002年）など，安全性面の改善が必要不可欠である。これまでに種々のベクターが開発されており，それぞれのベクターが持つ長所と短所（表1）を踏まえたうえで，臨床研究に用いられている。

本節では，遺伝子医薬品の DDS として，遺伝子治療用ベクターを中心にその現状と問題点について述べる。

3.1.1 ウイルスベクター

(1) アデノウイルスベクター

アデノウイルスベクターは，2004年の時点で遺伝子治療臨床研究のプロトコール数あたりで約26%を占めており，レトロウイルスベクターについて汎用されている。ヒトアデノウイルスは，小児の風邪を引き起こす原因ウイルスの一つで，現在までに約50種の血清型が発見されている。この中で遺伝子治療のベクターとして主に用いられているのは，2型と5型である。ウイルスゲノムは約36kbの直鎖状2本鎖DNAからなり，初期遺伝子（主にウイルスDNAの複製に関与）のE1～E4と，後期遺伝子（主にカプシドなどの構造蛋白質に関与）のL1～L5に大別される（図1）。ウイルス外殻は，240個のヘキソン，12個のペントンベースとファイバーからなる正20面体構造をしている。ウイルスの細胞内への侵入は，ファイバーがアデノウイルス受容体（coxsackievirus-adenovirus receptor（CAR）：2型や5型における受容体）に結合し，

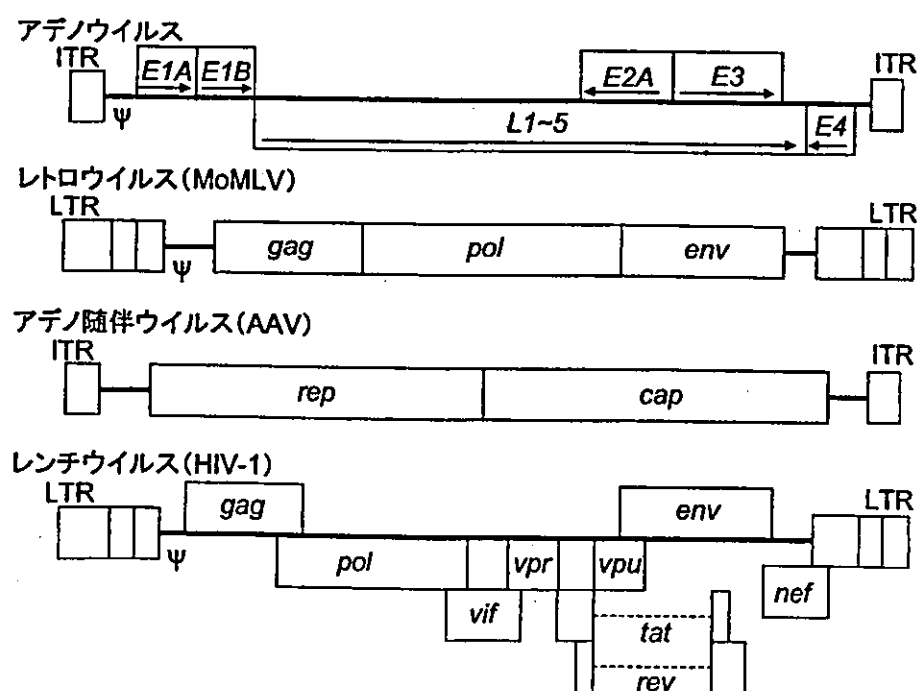


図1 代表的なウイルスゲノムの構造

Ψ：パッケージングシグナル，LTR：long terminal repeat，ITR：inverted terminal repeat

その後ペントンベースに存在する RGD (Arg-Gly-Asp) モチーフが、多くの細胞表面に存在するインテグリンと結合することによってエンドサイトーシス経路で進行する。

現在も主流の第一世代のアデノウイルスベクターは、ウイルスゲノムから E1A, E1B 遺伝子を欠失させ、その領域に目的遺伝子を挿入した構造をしている。挿入できる DNA のサイズを増やすために、ウイルス増殖には不必要な E3 領域も欠失させるのが一般的で、この場合約 7 kb までの外来 DNA が挿入できる。現在では E1/E3 欠失型ベクターに加え、E2a と E4 領域をも欠失したベクター、さらにはアデノウイルスがコードするほとんど全ての遺伝子を欠失した gutless ベクターも開発されている¹⁾。従来のベクターでは、ウイルス蛋白質をコードする遺伝子の非特異的な発現に伴う生体の免疫応答が課題となっていたが、gutless ベクターを用いることで、ウイルスベクター由来の免疫応答を軽減することが可能になると期待されている。

アデノウイルスベクターの作製法は Graham らの改良したプラスミドを用いる方法²⁾ が一般的であったが、この方法は煩雑であり、効率の悪い動物細胞内での相同組み換えを利用している

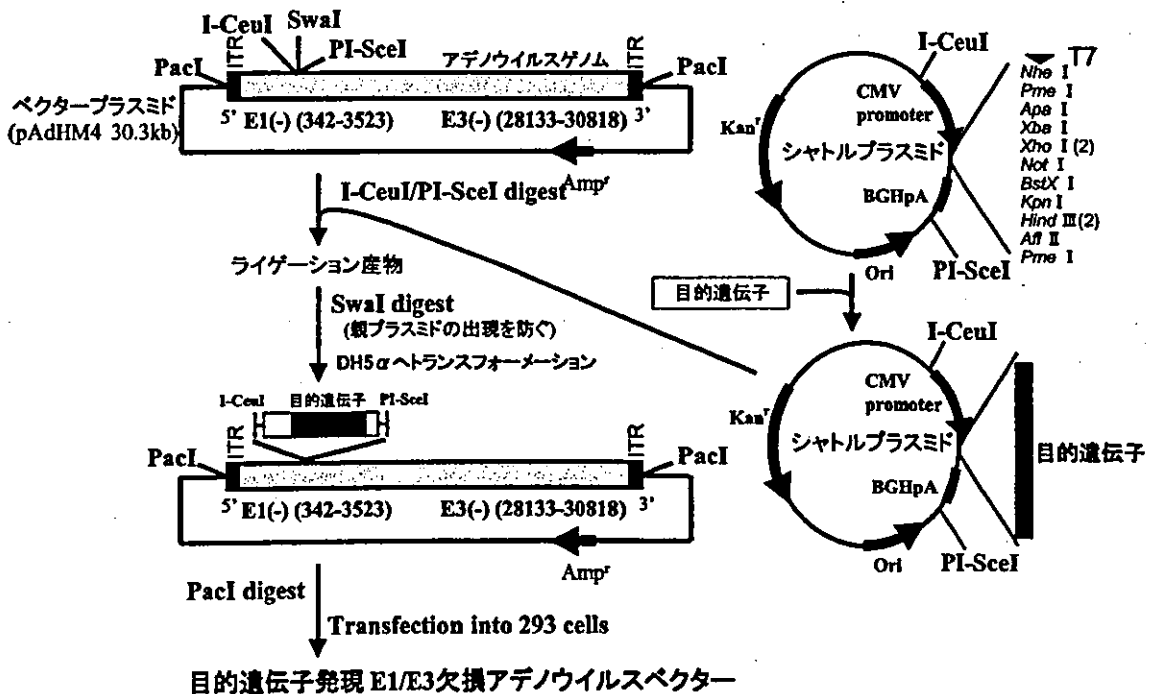


図2 *In vitro* ligation に基づいた簡便なアデノウイルスベクターの作製
シヤトルプラスミドに目的遺伝子を組み込み、I-Ceu I と PI-Sce I で切断する。これを I-Ceu I と PI-Sce I で切断したベクタープラスミド (アデノウイルスゲノムの全長を含む) と直接ライゲーションする。ライゲーション産物を Swa I 消化し、大腸菌にトランスフォーメーション、アンピシリンプレートに播種すると、目的の組換えプラスミドのみが選択できる。生じたプラスミドを Pac I で切断し、293 細胞にトランスフェクションすると、目的遺伝子を発現する組換えアデノウイルスベクターができる。

ため、ベクター作製効率が極端に低い。水口らは、この組み換えベクター作製の困難さを解決し、簡便なプラスミド構築に基づく方法を開発した³⁾ (図2)。彼らの方法は、9 bp 以上を認識する制限酵素である I-Ceu I と PI-Sce I を利用した簡便な *in vitro* ligation により、外来遺伝子を挿入した全長の組み換えアデノウイルス DNA を含むプラスミドを作製し、アデノウイルスの複製に必須である E1 発現細胞である 293 細胞 (ヒト胎児腎由来細胞) に導入するだけで組み換えアデノウイルスベクターができるというものである。この方法は、特別な技術や試薬を必要とせず、簡便に効率よく組み換えアデノウイルスベクターを作製でき、既にキット (BD Adeno-X, Clontech) として市販されている。

アデノウイルスベクターは、分裂・非分裂細胞を問わず多くの種類の細胞に対して効率よく遺伝子が導入でき、現存するベクターの中では抜群の遺伝子発現効率を有し、*in vitro* ではほぼ 100% の遺伝子発現効率を得ることも可能である。またアデノウイルスベクターは、レトロウイルスベクターと異なり濃縮が可能で、高力価 ($>10^{10}$ PFU/ml) のベクターを得ることができ、*in vivo* への直接投与も可能である。しかし、感染組織特異性に乏しい、免疫原性が高いなどの問題点を抱えている。感染域の制御にあたってはこれまでに、ウイルスファイバー部分に RGD ペプチドやポリリジン配列を挿入することで、インテグリンあるいはヘパラン硫酸を介して遺伝子導入されるベクターが開発されている⁴⁾。これらのベクターを用いることで、従来のアデノウイルスベクターでは遺伝子導入が困難であった CAR 欠損あるいは低発現の癌細胞や血球系細胞などに対しても高い遺伝子発現が可能となり、サイトカインやケモカイン遺伝子療法並びに DC ワクチン療法において優れた成果が得られている⁵⁻⁸⁾。また、アデノウイルスベクターのファイバー部分を、CAR 以外のレセプター (多くの細胞種に発現している CD46 など) を認識、感染する 35 型アデノウイルスのファイバーに置換したベクター⁹⁾ も開発されている。一方で、血中を介してのターゲティングを想定した場合、標的組織に効率よく移行させるためには克服すべき別の問題が存在する。例えば、アデノウイルスベクターは血中投与後速やかに血液中から消失してしまうため (マウスの場合 90% 以上は肝臓でトラップされる)、ベクターと標的組織との接触頻度が少なく、ターゲティングは困難である。また臨床においては、多くのヒトがアデノウイルスに対する中和抗体を保有しており、慢性疾患に対するベクターの連続投与の場合など、抗体存在下においても治療可能なベクターの開発も望まれている。これらの点について、アデノウイルスベクター表面をポリエチレングリコール (PEG) で化学修飾した PEG 修飾アデノウイルスベクターは、PEG 鎖の立体障害による CAR との結合阻害から、CAR を介した目的としない細胞への遺伝子導入が抑制され、結果的に血中滞留性が飛躍的に向上する。同様に中和抗体との結合も回避できること¹⁰⁾ を見出している。さらに我々は、PEG 鎖の先端に標的指向性分子を付与することにより、中和抗体存在下においても、標的分子を介して高い遺伝子発現が可能なベクター

の開発に成功している¹¹⁾。このようにベクターの表面蛋白質を直接的あるいは間接的に改変することにより、標的細胞選択性を制御し、これまで遺伝子導入が困難であった条件下、並びに細胞・組織に対して適応可能なベクターを開発しようとする試みは、アデノウイルスベクターをはじめとして広く行われており、今後の研究が期待される。

(2) レトロウイルスベクター

レトロウイルスは逆転写酵素を持つ RNA ウイルスの総称で、遺伝子治療には主にマウスの Moloney 白血病ウイルス (MoMLV) を基にしたベクターが利用されている。レトロウイルスベクターはウイルスゲノムの *gag* (ウイルス粒子内の構造蛋白質), *pol* (逆転写酵素), *env* (外殻蛋白質) のコーディング領域の大部分を取り除き (ウイルスゲノムがウイルス粒子内に取り込まれるためのパッケージングシグナル (Ψ) は残す), 両端のプロモーター活性を持つ LTR (Long Terminal Repeat) の間に目的遺伝子を挿入している (図 1)。レトロウイルスベクターの作製は、このベクタープラスミドをレトロウイルスのすべての構造蛋白質を産生しているパッケージング細胞に導入することで行う。これにより、 Ψ 配列と LTR は持っているが、ウイルスの複製に必要な *gag*, *pol*, *env* などの構造遺伝子は持たず、その領域に目的遺伝子をコードした RNA がウイルス粒子内に入り込み、組み換えウイルスベクターが作られる¹²⁾。

レトロウイルスベクターは、細胞に感染後、ウイルスゲノムが宿主染色体に組み込まれるため、ベクターに組み込んだ外来遺伝子を安定にかつ長期的に発現させることができる。しかしながら、レトロウイルスベクターは、分裂している細胞にしか遺伝子を導入することができないので、神経細胞、肝細胞、筋細胞のような、ほとんど分裂していない細胞には適用できない。一方、レンチウイルスやアデノ随伴ウイルス (AAV) は、非分裂細胞にも感染し、ウイルスゲノムが宿主染色体に組み込まれる。近年、この性質を利用したベクターが開発され、レトロウイルスベクターに代わる新しい遺伝子治療ベクターとして注目されている (後述)。

レトロウイルスベクターは遺伝子導入ベクターとして、最も古くから開発されてきたこともあり、現在遺伝子治療臨床試験のうち、全プロトコルの約 3 分の 1、患者数では約半分を占めており、わが国でも北海道大学や東京大学などで実施されている。しかし、臨床試験において、安全性に関する問題も明らかになっている。フランスで行われた伴性重症複合免疫不全症 (X-SCID) の小児に対する遺伝子治療では、レトロウイルスベクターを用いてインターロイキン受容体 γ C 鎖遺伝子が *ex vivo* で導入され、ほとんどの患者で免疫能の回復がみられた。ところが、治療後 2 年以上を経過すると、10 名中 2 名が白血病を発症した。調査の結果、白血病細胞の増殖に関与する LMO2 遺伝子の近傍に、ベクターのゲノムが組み込まれていたことが原因だと考えられている¹³⁾。導入遺伝子が染色体に組み込まれることは、安定した遺伝子発現が得られる一方で、挿入変異による発癌の危険性を合わせ持っている。今後は染色体へのゲノム挿入部位を調

節する因子の研究が、遺伝子治療の臨床応用にむけて重要である。

(3) アデノ随伴ウイルスベクター

アデノ随伴ウイルス (adeno-associated virus : AAV) は、アデノウイルスの培養系に混入してくる小型ウイルスとして発見されたパルボウイルスの仲間属するウイルスである。ヒト細胞に感染しうる 1~8 型の血清型が存在し、ベクターとして 2 型 AAV が主に用いられてきた。AAV は自立増殖できない非病原性のウイルスで、筋細胞・神経細胞などの非分裂細胞へも比較的、効率よく感染することから、ベクターとして注目されるようになった。ウイルスゲノムは 4.7kb の直鎖状一本鎖 DNA で、ゲノムの両端に T 型のヘアピン構造をした繰り返し構造 (inverted terminal repeat : ITR) があり、内側に 2 種類のウイルス蛋白質 (*rep* と *cap*) がコードされている (図 1)。AAV ベクターは、この *rep* と *cap* を取り除き、目的遺伝子に置換したものであり、温度や pH、プロテアーゼなどに高い抵抗性を示し、物理化学的には極めて安定である。しかし、4.5kb 以下の遺伝子しか挿入できない、遺伝子発現効率が低いなどの欠点があり、今後の改良が必要である。

最近の研究から AAV の血清型と標的細胞の関係が注目されてきており、標的とする組織や目的に応じて異なった血清型の AAV ベクターを用いる必要性が認識されてきた。従来、用いられてきた AAV2 ベクターと比較して、神経系細胞へは AAV5 ベクターが効率よく遺伝子を導入し¹⁴⁾、また肝臓へは AAV8 ベクターが適している¹⁵⁾ ことなどが明らかとなってきた。また AAV は、第 19 番染色体上の特定の位置に遺伝子が組み込まれるため、永続的な遺伝子発現が期待できるベクターとして注目されるようになったが、Rep 遺伝子を取り除いた組み換え AAV ベクターにおいては、現状では染色体への特異的組み込みが見られていない。しかし、ゲノムへの組み込みは基本的にランダムではあるが、活発に遺伝子発現している領域に起こりやすいとの報告¹⁶⁾ もあり、今後のさらなる解明が待たれている。

(4) レンチウイルスベクター

レンチウイルスは、レトロウイルスの一種であるので、生活環はレトロウイルスと同様である。ただし、一般のレトロウイルスと異なる特徴の一つは、神経細胞、筋細胞などの非分裂細胞にもゲノムを組み込むことができる点にある。これは、核膜を通過するための核移行シグナルによるものと考えられている。レンチウイルスベクターの中でも最も研究が進んでいるエイズウイルス (HIV-1 : human immunodeficiency virus type 1) の構造は、2 本の一本鎖 RNA ゲノム、逆転写酵素、インテグラーゼ、プロテアーゼなどをコア蛋白質が包んだ構造をしており、コアの外側をマトリックスが囲み、さらにその外側をエンベロープ蛋白質がスパイクした脂質二重膜が覆っている。HIV-1 は、エンベロープと細胞のレセプターが特異的に結合し、膜融合により細胞内に侵入する。その後、逆転写酵素によりウイルスゲノム DNA が作られ、それとウイルスが持ち

込んだ4種の核移行シグナル（それぞれウイルス蛋白質のインテグラーゼ、VPR (virus protein R)、ギャグマトリックス、及びウイルスゲノム中のcPPT (central polypurine tract) に存在している) が複合体を形成し、この複合体が核膜孔を積極的に通過すると考えられている。一方、他のレトロウイルスの場合、ウイルスゲノムが核膜孔を通過できないため、ウイルスゲノムの染色体への組み込みには細胞分裂に伴う核膜の消失が必要と考えられている。

代表的なレンチウイルスであるHIV-1のゲノム構造は、従来のレトロウイルスベクターと基本的には同じであるものの、いくつかの修飾遺伝子や制御遺伝子をコードしている点で一般的なレトロウイルスよりも複雑である(図1)。現在一般的に用いられているレンチウイルスベクターの作製法は、HIV-1のプロウイルスゲノムを、*gag*、*pol*以外の修飾遺伝子(*vif*、*vpr*、*vpu*、*nef*)並びに制御遺伝子(*tat*、*rev* (別のプラスミドに移している))を削除したパッケージングプラスミド、Revプラスミド、感染宿主域を広げたエンベローププラスミド、3'LTRのエンハンサー・プロモーター部分を削除して安全性を高めたSIN (self inactivating) ベクタープラスミドからなる4種類のプラスミドを293T細胞にトランスフェクションすることで行われている¹⁷⁾(図3)。レンチウイルスベクターが広く利用され始めたのは、なかでもエンベローププラスミドの改良によるところが大きい。HIV-1本来のエンベロープではCD4陽性細胞にしか感染することができなかったが、リン脂質をレセプターとするVSV-G (vesicular stomatitis virus G glycoprotein) をエンベロープに使うことにより、動物種、細胞種を問わずに感染させることができるようになった。また、VSV-Gの有する構造的な強さから、超遠心によるベクターの濃縮も可能となった。この4種類のプラスミドを用いるシステムにより、野生型HIV-1ゲノムは30%以下しか残されておらず、また各プラスミド間で、相同組み換えを起こしうる領域は最低限に抑えているため、自立増殖能を持った野生型ウイルスが出現してくる可能性はほとんどない。

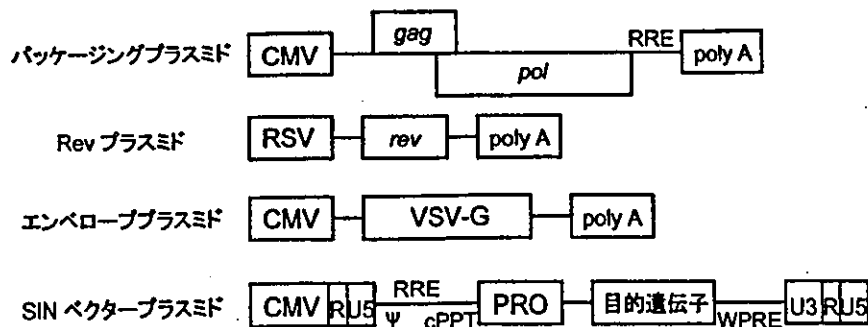


図3 HIV ベクターシステム

CMV : cytomegalovirus promoter, RSV : rous sarcoma virus promoter, RRE : rev responsive element, WPRES : woodchuck hepatitis virus posttranscriptional regulatory element, PRO : promoter

実際これまでに HIV ベクターの調整過程で野生型 HIV-1 や複製可能なウイルスが検出されたことはなく、動物実験でも病原性はみられていない。

近年、短い RNA 配列を用いて特定遺伝子の発現を抑制する RNA interfering (RNAi, RNA 干渉) が、遺伝子医薬品や遺伝子機能解明ツールとして注目されている。この RNAi 効果をレンチウイルスベクターを用いて発揮させることで、恒常的に遺伝子発現を抑制し、簡易ノックアウトモデルを作製するという試みが行われている。具体例としては、脂肪細胞などでみられる Peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARgamma) の発現を抑制する shRNA (short hairpin RNA) 発現レンチウイルスベクターを用いて、脂肪細胞の分化過程に対する PPARgamma の働きを明らかにする¹⁸⁾ といった報告がなされている。レンチウイルスベクターはまだ開発途上ではあるが、現在最も期待されている次世代ベクターの1つであり、霊長類動物モデルでの安全性、有効性のデータの蓄積が今後の課題である。また米国に続き、日本においてもレンチウイルスベクターの取り扱いが P3 レベルから P2 レベルに引き下げられたことで、今後レンチウイルスベクターを用いた検討は一層増加するものと考えられる。

3.1.2 非ウイルスベクター

非ウイルスベクター法には、裸のプラスミド DNA (naked DNA) をそのまま用いる方法と、それら DNA を運ぶ担体として人工的なキャリアーを用いる方法がある。後者のキャリアーとしては、リボソーム、高分子ミセル(「第4章、第7項、高分子ミセル化医薬の構造設計と機能開発」参照)、レセプター介在性遺伝子導入法(細胞表面のレセプターに結合するリガンド分子や組織特異的な細胞表面抗原に対する抗体と DNA の複合体を用いて特定の細胞に遺伝子を導入する)などがある。さらには、プラスミド DNA をアテロコラーゲン¹⁹⁾ やカチオン化ゼラチン²⁰⁾ などに抱埋することでプラスミド DNA を生体内で徐放させ、治療効果を増強させる試みもなされている。

一方でキャリアーを用いない方法としては、naked DNA を直接組織に注入する方法に加えて、ハイドロダイナミクスインジェクション法²¹⁾ (大量の DNA 溶液を急速尾静注することにより肝臓への遺伝子導入が起こる)、エレクトロポレーション (電気パルスにより細胞膜透過性を一時的に上昇させる方法)、遺伝子銃 (DNA を径 0.5~3 μm 程度の金粒子に付着させておき、高速で直接細胞内に射入する方法) などが報告されている。実際、大阪大学で行われた閉塞性動脈硬化症患者に対する遺伝子治療(血管内皮増殖因子の遺伝子導入)は、naked DNA を筋肉内へ直接注入する方法である²²⁾。

非ウイルスベクターについて本稿では、最も開発が進んでいるカチオニックリボソーム、及び、日本独自に開発された膜融合型ベクターについて述べる。

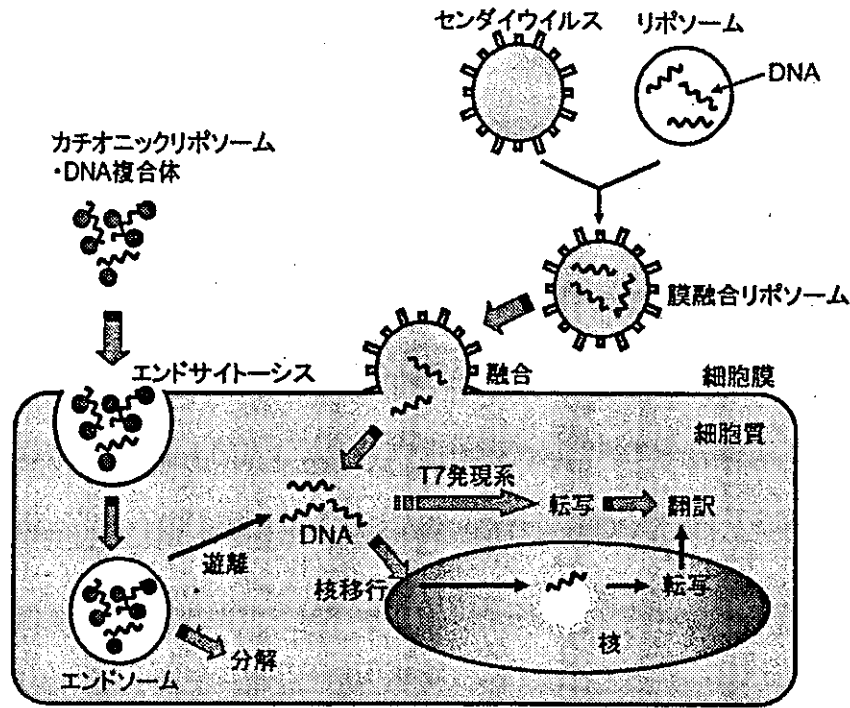


図4 カチオンリポソームと膜融合リポソームによる遺伝子導入と遺伝子発現

(1) カチオンリポソーム

リポソームは1965年 Bangham によって見出された脂質二重膜を持つ閉鎖小胞²³⁾であり、一部は抗癌剤などのキャリアーとしてすでに臨床応用されている。遺伝子導入ベクターとしては、1987年に Felgner らが合成脂質を用いたカチオンリポソームが高い遺伝子発現効率を示すことを報告して以来、多数のカチオンリポソームが開発され、脂質の種類や添加脂質（コレステロールなど）の利用条件の最適化が行われるなど、研究試薬として広く汎用されている。このカチオンリポソーム法は正電荷を持つカチオンリポソームと負電荷を持つDNAが静電的相互作用により安定な複合体を形成することで、DNAの組織内外での安定性を向上させるだけでなく、リポソームの正電荷により、負電荷の細胞膜との相互作用を強めDNAの細胞内への導入を促進しようとするものである（図4）。

このカチオンリポソーム法は免疫原性や野生型ウイルスの出現などのウイルスベクターの持つ危険性がないという長所を有している。しかし一般にカチオンリポソームは、エンドサイトーシス経路で細胞内へ取り込まれ、多くはリソソームで分解を受けてしまうため、高い遺伝子発現効率を得るためにはエンドソームから細胞質へのエスケープ効率を改善する必要がある。これについては、膜融合型リポソームを用いる（後述）、あるいはリソソーム内の弱酸性環境において膜破壊能を持つペプチドなどを利用した方法が行われている²⁴⁾。また Boussif らにより提唱された、DNAをエンドソームから細胞質内へ移行させるための、「プロトンスポンジ」とい

う機構²⁵⁾も利用されている。ポリエチレンイミンなどのポリカチオンを有するカチオニックリポソームでは、エンドサイトーシスによる内在化の後、エンドソーム膜上のプロトン ATPase によりエンドソーム内の pH が下げられる時に、エンドソーム内へ集積してきたプロトンをポリカチオンが消費し、pH の低下を抑制する。これによりエンドソーム内へ塩化物イオンの流入を伴ったプロトンの集積が続くことで、浸透圧が増大する。その結果、エンドソーム内外の浸透圧のバランスがくずれ、遂にエンドソームが崩壊し、内包物を細胞質内へ放出するというものである。

(2) 膜融合型ベクター

膜融合型ベクターとしては、主にセンダイウイルス (hemagglutinating virus of Japan : HVJ) の膜融合能を利用したベクターの開発が進んでおり、遺伝子をはじめ様々な分子に対する導入キャリアーとして有用であり、すでにキット化されているものもある (HVJ envelope vector, 石原産業)。我々が中西らと共に開発した膜融合リポソーム^{26~28)}は、センダイウイルスの膜融合能をリポソームに付与したものであり、その内部に封入可能なあらゆる物質を細胞膜との融合により直接細胞質内に導入できる日本独自のハイブリッド型ベクターである (図4)。

膜融合リポソームはウイルスは使用するが、事前に紫外線照射によりセンダイウイルス自身の遺伝子 (RNA) を完全に断片化しておくため、感染の心配がなく機能面では細胞膜との融合作用だけを有するウイルス粒子となっている。またセンダイウイルスはもともとヒトに対して病原性がないため、他のウイルスベクターのような危険性はない。この膜融合リポソームは、エンドサイトーシスによる取り込みではなく細胞膜との融合によりリポソーム内の物質を直接細胞質内に放出するのでリソソーム酵素による分解を受けない。膜融合リポソームの遺伝子導入ベクターとしての能力をカチオニックリポソームのリポフェクチンと比較した場合、*in vivo* で 1600 倍以上も高い遺伝子発現が得られている²⁶⁾。さらに、ウイルスベクターとは異なり、リポソーム内に封入することができれば、導入する遺伝子に制約がなく、従来の遺伝子導入ベクターでは不可能であった抗原蛋白質や遺伝子発現調節因子などの生理活性蛋白質、RNA decoy、ファージやナノスフェアなどの粒子をも自由に効率よく導入することができることから、今後の臨床応用に期待が持たれる^{29~36)}。

3.1.3 細胞内動態

薬物としての遺伝子が作用を発現するためには、細胞外から細胞質を通り核へと移行し、治療効果のある蛋白質にまで転写される必要がある。アデノウイルスベクターのように、細胞内に導入された遺伝子が核にまで効率よく送達される機能を有するベクター³⁷⁾に関しては、高い遺伝子発現が得られるが、非ウイルスベクターに共通する問題点として、細胞内に導入された遺伝子 (プラスミド DNA) にはその様な機能がないため核への移行が制限され、ウイルスベクターに

匹敵する遺伝子発現を得ることが困難である。しかし非ウイルスベクターの特徴は、導入遺伝子の形状やサイズに制約が少なく、遺伝子発現効率の上昇や機能付与といった遺伝子側の改良ができる点にある。これまでに細胞内の物質動態制御に関しては、特定のオルガネラに指向性のあるウイルス蛋白質や細胞内蛋白質などにおいて、その物質の移行制御に関わる特異的アミノ酸配列や機構に関して盛んに研究され、多くの情報が蓄積されてきている。原島らはこれらの情報を基にプラスミドの形状を工夫した上で、核移行シグナルを利用することで、細胞内動態制御に基づく核へのターゲティングを試みている³⁸⁾。

一方、遺伝子の核移行問題を解決するために、通常の核内での遺伝子発現系ではなく細胞質内で効率よく遺伝子発現させる T7 発現系の開発も行われている^{39, 40)}。この方法は、バクテリオファージの T7 RNA ポリメラーゼとそのプロモーターを有するプラスミド DNA を、同時に細胞内に導入することにより、通常の核内における遺伝子発現とは完全に独立した形で、細胞質内で遺伝子発現を行わせようとするものである (図 4)。本アプローチにより、分裂細胞、非分裂細胞、また細胞種によるプロモーター活性の違いに関わらず、あらゆる細胞に対して同様な効率で遺伝子発現できる可能性が考えられる。近年、目的遺伝子の両末端に β -globin の untranslated regions (UTR) 領域を組み込むと同時に、T7 RNA ポリメラーゼをコードする mRNA を用いることで、遺伝子発現効率の改善と共に転写された mRNA の安定性及び翻訳効率が向上し、遺伝子の発現増強及び持続性が改善され⁴¹⁾、今後の更なる展開が期待される。

3.1.4 導入遺伝子の発現制御

遺伝子治療をより安全かつ有効な治療法として確立していくためには、導入遺伝子を病状に応じて発現調節できるシステムが必須である。サイトカインなどの様に少量で強い生理活性を示す蛋白質を発現させる遺伝子治療の場合では、仮に導入遺伝子が過剰発現すると重篤な副作用につながる危険性がある。

遺伝子発現を自由に制御できる方法として、tTA (tetracycline-responsive transcriptional activator) あるいは, rtTA (reverse tetracycline-responsive transcriptional activator) と、この両者の作用により転写活性を制御できるプロモーターの 2 つのコンポーネントからなる、Tet-On 及び Tet-Off システムがある⁴²⁾ (図 5)。我々は、この Tet-Off システムをアデノウイルスベクターに適応することで、*in vivo*においても、全く毒性を示さない濃度範囲のテトラサイクリンにより、導入遺伝子の発現制御が達成され、このシステムを利用した IL-12 遺伝子による癌遺伝子治療の最適化が可能であることを報告している⁴³⁾。近年、水口らは *in vitro* ligation に基づいて複数の外来遺伝子を搭載可能なアデノウイルスベクターを構築⁴⁴⁾し、この制御系を単一のアデノウイルスベクターに搭載したシステムを開発している⁴⁵⁾。詳細は割愛するが、tTA の発現単位を E3 欠損領域に、テトラサイクリン制御性プロモーター下に目的遺伝子を発現

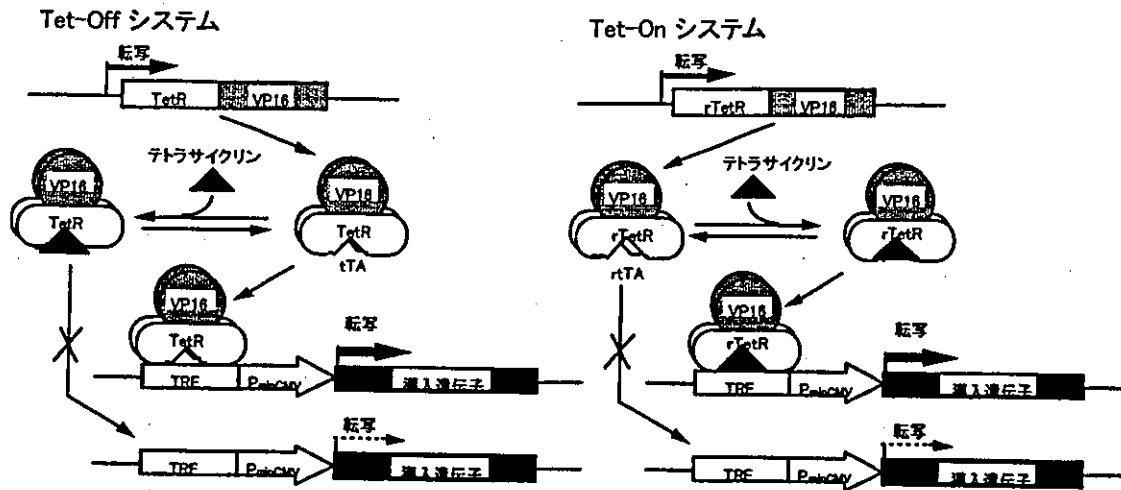


図5 テトラサイクリンによる遺伝子発現制御

tTA は tet receptor (TetR) と単純ヘルペスウイルスの VP16 活性化ドメインとからなる融合蛋白質であり, TetR を介して tetracycline-responsive element (TRE) に結合し, 転写を活性化する。しかし, テトラサイクリン存在下では, tTA の TRE への結合が阻害されるため, テトラサイクリンの濃度に応じて転写が抑制される (Tet-Off システム)。逆に reverse-TetR (rTetR) と VP16 との融合蛋白質を用いると, テトラサイクリン存在下でのみ TRE に結合でき, 転写を活性化できる (Tet-On システム)。破線矢印は, その向きの転写が起こっていないことを示し, 太い矢印は, その向きの転写が盛んに起こっていることを示す。

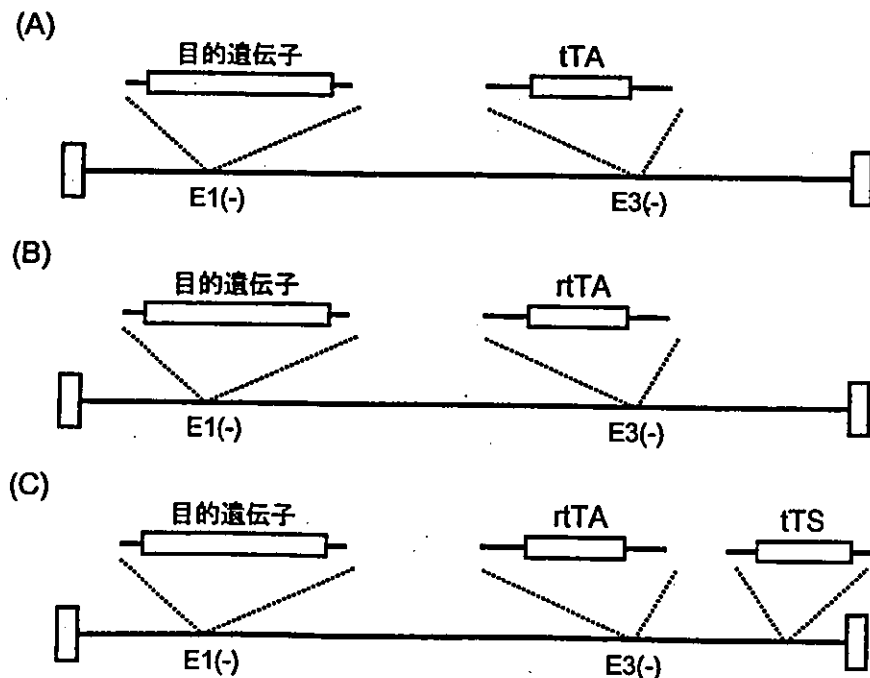


図6 発現制御型アデノウイルスベクターの構造

(A) Tet-Off 発現制御型アデノウイルスベクター

(B) Tet-On 発現制御型アデノウイルスベクター

(C) 改良型 Tet-On 発現制御型アデノウイルスベクター

する単位を E1 欠損領域に挿入することで作製した Tet-Off 系のアデノウイルスベクター (図 A) は、作用させたテトラサイクリンの濃度に応じた目的遺伝子の発現抑制能を示す。また、Tet-On 系を搭載したアデノウイルスベクターの場合には、rtTA 発現単位を E3 欠損領域に、目的遺伝子発現単位を E1 欠損領域に挿入することで、同様にテトラサイクリン依存性の発現能を有するベクターを開発している (図 6 B)。さらに転写抑制因子の tTS (tetracycline-controlled transcriptional silencer) 発現単位を E4 領域と 3'ITR の間の領域に挿入することで、トリプル遺伝子発現系からなる、より優れた発現制御能を有するベクターシステムを構築している (図 6 C)。これらのシステムにより、最小限のベクター使用で、薬剤を人為的に加えることによって、目的遺伝子の発現を正あるいは負の両方向に対して効率よく制御することが可能となった。本方法は、そもそも哺乳動物の細胞に存在しないシステムを用いているため、ゲノム遺伝子の発現にはなんら影響を与えることなく目的の遺伝子の発現だけを厳密に制御できる特徴を有しており、安全かつ効果的な遺伝子治療の実現を目指すうえで有効な手段になりうると考えられる

文 献

- 1) Maione D. *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **98**, 5986 (2001)
- 2) McGrory W. J. *et al.*, *Virology*, **163**, 614 (1988)
- 3) Mizuguchi H. *et al.*, *Hum. Gene Ther.*, **9**, 2577 (1998)
- 4) Koizumi N., *et al.*, *Biochim Biophys Acta.*, **1568**, 13 (2001)
- 5) Okada N. *et al.*, *Cancer Res.*, **1**, 7913 (2001)
- 6) Gao J. Q. *et al.*, *Cancer Res.*, **63**, 4420 (2001)
- 7) Okada Y. *et al.*, *Jpn J Cancer Res.*, **93**, 436 (2002)
- 8) Okada N. *et al.*, *Gene Ther.*, **10**, 1891 (2003)
- 9) Koizumi N., *et al.*, *J Virol.*, **77**, 13062 (2003)
- 10) Eto Y., *et al.*, *Biol Pharm Bull.*, **27**, 936 (2004)
- 11) Eto Y., *et al.*, *J. Gene Med.*, in press
- 12) Miller A. D., *Curr. Top. Microbiol. Immunol.*, **158**, 1 (1992)
- 13) Hacein-Bey-Abina S. *et al.*, *Science*, **302**, 415 (2003)
- 14) Davidson B. L. *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **97**, 3428 (2000)
- 15) Gao G. P. *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **99**, 11854 (2002)
- 16) Nakai H. *et al.*, *Nat. Genet.*, **34**, 297 (2003)
- 17) Miyoshi H. *et al.*, *Science.*, **29**, 682 (1999)
- 18) Katayama K. *et al.*, *FEBS Lett.*, **27**, 178 (2004)
- 19) Ochiya T. *et al.*, *Current Gene Ther.*, **1**, 31 (2001)

- 20) Kobayashi N. *et al.*, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **297**, 853 (2001)
- 21) Fukunaka Y. *et al.*, *Journal of Controlled Release*, **80**, 333 (2002)
- 22) Morishita R. *et al.*, *Hypertension*, **44**, 203 (2004)
- 23) Bangham A.D. *et al.*, *J. Mol. Biol.*, **13**, 238 (1965)
- 24) Ohmori N. *et al.*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **235**, 726 (1997)
- 25) Boussif O. *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **92**, 7297 (1995)
- 26) Mizuguchi H. *et al.*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **218**, 402 (1996)
- 27) Mizuguchi H. *et al.*, *Cancer Res.*, **58**, 5725 (1998)
- 28) Mizuguchi H. *et al.*, *Virus. Res.*, **59**, 191 (1999)
- 29) Mizuguchi H. *et al.*, *Br J Cancer.*, **73**, 472 (1996)
- 30) Mizuguchi H. *et al.*, *Cancer Lett.*, **100**, 63 (1996)
- 31) Hayashi A. *et al.*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **261**, 824 (1999)
- 32) Nakanishi T. *et al.*, *Eur. J. Immunol.*, **30**, 1740 (2000)
- 33) Kondoh M. *et al.*, *Biol Pharm Bull.*, **23**, 1011 (2000)
- 34) Kunisawa J. *et al.*, *Advanced Drug Delivery*, **57**, 177 (2001)
- 35) Kunisawa J. *et al.*, *J Immunol.* **1**, 1406 (2001)
- 36) Nakagawa S. *et al.*, *Drug Metabol. Pharmacokin.*, **18**, 223 (2003)
- 37) Greber U. F. *et al.*, *Cell*, **75**, 477 (1993)
- 38) Akita H. *et al.*, *Mol Ther.*, **9**, 443 (2004)
- 39) Mizuguchi H. *et al.*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **234**, 15 (1997)
- 40) 鈴木亮ほか, *Drug Delivery System*, **13**, 27 (1998)
- 41) Nakano R. *et al.*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **301**, 974 (2003)
- 42) Gossen M. *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **89**, 5547 (1992)
- 43) Nakagawa S. *et al.*, *Pharmaceutical Sciences*, **13**, 53 (2001)
- 44) Mizuguchi H. *et al.*, *J. Gene Med.*, **4**, 240 (2002)
- 45) Mizuguchi H. *et al.*, *Biotechniques*, **30**, 1112 (2001)

機能性細胞の創製と Cell Delivery System

吉川友章 真弓忠範 中川晋作

はじめに

生命体は形態的・機能的に異なるさまざまな細胞から構成されており、これら細胞は巧妙な細胞間情報伝達機構を駆使して相互の調和を保っている。それら高度な機能を有する分化細胞は、必要な時に、必要な場所で、必要な量だけ未分化細胞から分化する。またその分化した細胞は、生命体の内外環境の変化を察知するセンサー機能を有し、必要なときに、必要な部位で、必要な量の生理活性物質を作用させることにより生命体を維持している。この高度に分化した細胞自身ならびにその細胞から産生される生理活性物質を薬物と見立てた場合、細胞は体内でまさしくDrug Delivery System (DDS) を実践している粒子であり、機能面において細胞に勝る製剤素材はない。したがって、治療に適した機能性細胞を薬物として捉えた細胞療法は、理想的な究極の治療法へと発展していく可能性を秘めている。薬学的観点に立つと、この方法による剤形は「細胞性製剤」とも呼ぶべきものである。また安全かつ有効な細胞療法を行うためには、疾病治療に働く薬としての機能性細胞を創製し、それを「細胞性製剤」として生体に適用するための“Cell Delivery System”ともいえるべきDDS概念が重要になってくる。本稿では、細胞療法における機能性細胞の創製とCell delivery systemに関するわれわれの取り組みについて概説する。

機能性細胞の創製

細胞の分離・加工・培養技術が進歩したことにより、樹状細胞 (DC) やT細胞などを用いた細胞免疫療法や、ほとんどすべての細胞に分化・増殖させることが可能な胚性幹細胞 (ES細胞)、骨髄・体性幹細胞を用いた再生医療・細胞治療が注目されており、現在ではさまざまなベンチャー企業が参入している (表)。例えば、ジェロン社はヒトES細胞に複数の成長因子を作用させて心筋細胞、骨芽細胞、膵臓β細胞など、さまざまな細胞に分化させる技術の開発に成功しており、細胞療法への実用化をめざしている。また、エキサイトセラピーズ社は、抗原で表面を修飾した微粒子 (人工抗原提示細胞) を用いた独自のT細胞活性化法を開発し、患者のT細胞を用いた腫瘍免疫療法への展開を計画している。これらは、発生工学や細胞工学的手法により機能性細胞を作製・利用した細胞療法の一例である。一方、岡田らはDCに対して高効率で遺伝子導入可能な改変型アデノウイルスベクター (Ad) を用いて機能性DCを作製し、このDCを細胞性製剤として捉えたDCワクチン療法の最適化に取り組んでいる。Adは、現存する遺伝子導入ベクターの中で最高の遺伝子導入効率を誇っているが、DCや一部のリンパ球などに対しては導入効率が悪い。この点について、遺伝子導入時にウイルス粒子と細胞との接着に関与する外殻タンパク質の一部に、接着分子 (インテグリン) と高い親和性を有するRGDモチーフを導入したAd (AdRGD) が、従来型のAd

に比べて遺伝子発現効率・遺伝子導入効率共に著しく高いことを見出した¹⁾。このAdRGDを用いることでDCにおいて抗原遺伝子の高い発現が可能となり、*in vivo*へ適用した場合、従来型のAdを用いた場合と比較して顕著な腫瘍特異的免疫応答が誘導された²⁾。本結果は、癌患者末梢血より単離・分化誘導したDCを有効に利用し、かつ効果的な免疫応答を惹起することができる機能性細胞 (細胞性製剤) を創り出すという観点から、DC免疫療法において非常に有用性の高いベクターシステムであると考えられる。また、われわれは遺伝子だけでなく、機能性核酸や抗原タンパク質さらには機能性ナノ粒子など、リボソームに封入可能な物質をほぼすべての動物細胞の細胞質内へ効率的かつ簡単に導入できる膜融合リボソームを開発した³⁾。この技術を利用して癌抗原タンパク質や抗原ペプチドを抗原提示細胞の細胞質内へ導入することで、細胞傷害性T細胞を効率よく誘導できる抗原提示細胞を創り出すことができ、効果的なワクチン療法が達成できることを明らかにしている⁴⁾⁵⁾。

以上、細胞内に遺伝子や生理活性物質を導入して新たな機能性細胞を創り出す技術の開発は、今後ますます発展し、それに伴い細胞療法への展開が飛躍的に拡充していくものと思われる。

細胞療法の最適化を目指したCell delivery system技術の開発

疾病治療に有効な機能性細胞を「細胞性製剤」として生体に適用するにあたり、

表 細胞療法に参入している主なベンチャー

アイソティス社	繊維芽細胞 ケラチン細胞	糖尿病性皮膚潰瘍	Phase II
アイソラージェン社	繊維芽細胞	やけど、しわ、にきび跡	Phase III
インターサイテックス社	繊維芽細胞 毛根細胞	糖尿病性皮膚潰瘍 自己毛根細胞の増殖	Phase I
ジーンベック社	心筋細胞	心筋梗塞	Phase I
ジェンザイム・バイオ	表皮細胞	火傷治療	販売中 (Epicerl)
サージェリー社	軟骨細胞	関節軟骨損傷治療	販売中 (Carticel)
チタン・ファーマ シューティカルス社	ドーパミン産生ヒト網膜色素上皮細胞	パーキンソン病	Phase II
ジェネティクス・ ファーマシューテカルズ社	MDR遺伝子導入造血幹細胞 (レトロウイルスベクター)	癌治療	Phase II
イムン・レスポンス社	IL-2, GM-CSF遺伝子導入 繊維芽細胞	癌ワクチン	Phase I
セレジン社	NGF遺伝子導入繊維芽細胞	アルツハイマー病治療	Phase I
ニューロテック社	NT-501, CNTF遺伝子導入 網膜上皮細胞 (半透性カプセルに封入)	色素性網膜炎治療	Phase I
ウイルキシス社	抗HIVアンチセンス導入T細胞 (レンチウイルスベクター)	エイズ治療	Phase I
エキサイト・セラピーズ社	T細胞 (患者の血液から分離したT細胞をマイ クロビーズ (人工抗原提示細胞) で活性化)	癌治療	Phase I
セレキシス社	T細胞 (抗原特異的T細胞の迅速増幅法)	エイズ, メラノーマ治療	Phase I
デンドレオン社	樹状細胞 (樹状前駆細胞を Antigen Delivery Cassetteで刺激)	癌治療	Phase III
ノースウェスト・バイオ セラピューティクス社	患者由来樹状細胞	癌治療	Phase II (休止中)
ジェンザイム・オンコロジー社	樹状細胞と癌細胞の融合細胞	癌治療	Phase I / II
アーストローム社	骨髓幹細胞, 抗原ペプチドパルス樹状細胞	癌化学療法後の血球, 免疫の維持 (自己骨髓移植)	販売中
イキシオン・バイオテクノロジー社	成人すい臓細胞	1型糖尿病治療	Phase II
オサイリス・セラピューティクス社	間葉系細胞	骨髓移植	Phase II
キュリス社	成人幹細胞	1型糖尿病治療	—
ジェロン社	ES細胞	虚血性心疾患, 骨粗しょう症治療	—
ステムセルズ社	神経幹細胞	アルツハイマー病治療	前臨床
セルジェニクス社	幹細胞	患者特異的ワクチン	Phase I

日経バイオビジネス2004年7月号より改変

一般薬物におけるDDSと同様、細胞療法における「細胞性製剤」の投与形態並びに投与後の体内動態を制御する新たな *Cell Delivery System* 技術の開発 (図) が必要である。

遺伝子導入などにより新たな機能が付与された機能性細胞や多分化能を有する幹細胞などを生体に適用するとき、そのままの状態では疾病治療に有効であればこれ以上何ら手を加える必要はなく、細胞性製剤として直接生体内に投与すればよい。しかしこの場合の細胞は、自己あるいは組織適合性抗原が患者に適合している細胞に限られる。将来的に機能性細胞あるいは幹細胞を自己の細胞から調製するのではなく、広く非自己の細胞をも利

用できうようになれば、応用範囲は著しく拡大することになる。非自己の機能性細胞を細胞性製剤として疾病治療に適用するためには、宿主の免疫系から完全に回避して拒絶反応を防ぎ、体内で安定に機能させる方法を開発する必要がある。われわれは、免疫担当細胞をはじめ生体防御因子の進入を防ぐことができる高分子膜で機能性細胞を包埋することにより、同種異系細胞でも適応可能な細胞性製剤の開発を行っている⁶⁾。これまでにアルギン酸とポリ (L) リジンのイオンコンプレックスで作製したAPAマイクロカプセル内に、生理的グルコースセンサー機能を有し、グルコース濃度に応じてインスリンを分泌する膵臓β細胞を封

入した「細胞性製剤」を作製し、その糖尿病治療薬としての有効性を検討してきた。この「細胞性製剤」を本細胞とアロジェニックな関係の糖尿病モデルマウスの腹腔内に投与した結果、血糖値が厳密に制御され、致命的な低血糖を招くことなく1回の投与により長期間に渡る糖尿病治療が達成された⁷⁾。本研究は、細胞性製剤の臨床応用に向けた問題点の一部を解決する *Cell Delivery System* を提示したものであり、これら技術の蓄積により夢の細胞療法の実現につながるだろう。

さらにわれわれは、薬物として働く機能性細胞の体内動態を制御することによる癌免疫療法の最適化を試みている。抗腫瘍免疫応答の第一段階は腫瘍局所で癌