

in human postnatal bone marrow are AC133⁺, CD34⁻, VE-cadherin⁻, and KDR⁺ cells. We did not perform a comparison among AC133⁺, CD34⁻, and AC133⁻ CD34⁺ cells in terms of endothelial progenitor ability. Further research is required to clarify the origin of endothelial progenitor ability.

Chronological analysis of the alteration of endothelial markers on cultured AC133⁺ cells revealed that the expression of CD31 (PECAM-1) on AC133⁺ cells was the earliest event among the tested markers. The peak of expression of KDR was observed at 2 weeks after the inoculation, and the expression of eNOS did not change during 3 weeks. On the other hand, few CD11b positive cells appeared from AC133⁺ cells, suggesting that AC133⁺ cells mainly differentiate into endothelial cells under our experimental conditions.

Since we postulated that CD31 may be an early indicator during endothelial differentiation, we examined the relationship between CD31 expression and the ability to differentiate into endothelial cells in cells derived from AC133⁺ cells. CD31-bright cells, which were sorted from AC133⁺ cells cultured on type IV collagen-coated dishes, appeared to express more endothelial cell-markers than did CD31-positive or CD31-negative cells. Therefore, CD31-bright cells may be precursor cells for endothelial cells. CD31 (PECAM-1) is a 130-kDa member of the Ig superfamily expressed not only on endothelial cells, but also on monocytes, lymphocytes, and polymorphonuclear leukocytes (Vaporciyan et al., 1993; Newman, 1994; Newman et al., 1997; Chosay et al., 1998). CD31 functions as an adhesion and signaling molecule between adjacent endothelial cells and between endothelial cells and circulating blood elements. In the present study, AC133⁺ cells differentiated more efficiently into endothelial cells when they were plated on FN-coated dishes than when they were plated on collagen type I- and type IV-coated dishes, suggesting that the FN as an extracellular matrix plays a significant role in the endothelial differentiation of AC133⁺ cells. Antibodies directed against PECAM-1 (CD31) have been shown to affect angiogenesis (Mahooti et al., 2000). Therefore, one possible explanation is that early expression of CD31 on cultured AC133⁺ cells may participate in a functional role in endothelial differentiation.

Recently, new biotechnology using cell/tissue (cell therapy) has been developed for therapeutic applications in grave inherited diseases or lethal ailments. Endothelial progenitor cells have been recently isolated from peripheral blood and bone marrow, and have been shown to be incorporated into sites of physiological and pathological neovascularization in vivo (Asahara et al., 1999). In contrast to differentiated endothelial cells, the transplantation of endothelial progenitor cells successfully enhanced vascular development by in situ differentiation and proliferation within ischemic organs. On the other hand, these endothelial progenitor cells are shown to express CD34 or AC133 on their cell surfaces (Asahara et al., 1997; Kalka et al., 2000; Peichev et al., 2000; Gaugler et al., 2001; Gill et al., 2001). These markers are also well known to be expressed on blood stem cells (Yin et al., 1997; de Wynter et al., 1998; Punzel and Ho, 2001). The isolation of endothelial progenitor cells using these markers may also lead to the collection of

stem cells. Therefore, the ability of endothelial progenitor cells to produce endothelial cells could be evaluated to exclude the effects of blood stem cells. In the present study, we disclosed that CD31-bright cells derived from AC133⁺ cells are able to differentiate to endothelial cells as a precursor cell. While the role of CD31 in the differentiation of endothelial cells from their progenitor cells remains unclear, the early expression of CD31 on cultured AC133⁺ cells during endothelial differentiation can be utilized as a marker of the endothelial precursor.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Saitama Red-Cross of Japan for their kind cooperation.

LITERATURE CITED

- Asahara T, Murohara T, Sullivan A, Silver M, van der Zee R, Li T, Witzensichler B, Schattman G, Isner JM. 1997. Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. *Science* 275:964-967.
- Asahara T, Masuda H, Takahashi T, Kalka C, Pastore C, Silver M, Kearne M, Mager M, Isner JM. 1999. Bone marrow origin of endothelial progenitor cells responsible for postnatal vasculogenesis in physiological and pathological neovascularization. *Circ Res* 85:221-228.
- Asahara T, Kalka C, Isner JM. 2000. Stem cell therapy and gene transfer for regeneration. *Gene Ther* 7:451-457.
- Boheler KR, Fiszman MY. 1999. Can exogenous stem cells be used in transplantation? *Cells Tissues Organs* 165:237-245.
- Bordignon C, Carlo-Stella C, Colombo MP, De Vincentiis A, Lanata L, Lemoli RM, Locatelli F, Olivieri A, Rondelli D, Zanon P, Tura S. 1999. Cell therapy: Achievements and perspectives. *Haematologica* 84:1110-1149.
- Chosay JG, Fisher MA, Farhood A, Ready KA, Dunn CJ, Jaeschke H. 1998. Role of PECAM-1 (CD31) in neutrophil transmigration in murine models of liver and peritoneal inflammation. *Am J Physiol* 274:G776-782.
- de Wynter EA, Buck D, Hart C, Heywood R, Coutinho LH, Clayton A, Rafferty JA, Burt D, Guenechea G, Bueren JA, Gagen D, Fairbairn LJ, Lord BI, Testa NG. 1998. CD34⁺ AC133⁺ cells isolated from cord blood are highly enriched in long-term culture-initiating cells, NOD/SCID-repopulating cells and dendritic cell progenitors. *Stem Cells* 16:387-396.
- Efrat S. 2001. Cell therapy approaches for the treatment of diabetes. *Curr Opin Investig Drugs* 2:639-642.
- Flax JD, Aurora S, Yang C, Simonin C, Wills AM, Billingham LL, Jendotubi M, Sidman RL, Wolfe JH, Kim SU, Snyder EY. 1998. Engraftable human neural stem cells respond to developmental cues, replace neurons, and express foreign genes. *Nat Biotechnol* 16:1033-1039.
- Gaugler M-H, Squiban C, Mouthon M-A, Gourmelon P, Van derMeeren A. 2001. Irradiation enhances the support of haemopoietic cells transmigration, proliferation, and differentiation by endothelial cells. *Br J Haematol* 113:940-950.
- Gehling UM, Ergun S, Schumacher U, Wagener C, Pantel K, Otte M, Schuch G, Schafhausen P, Mende T, Kilic K, Schafer B, Hossfeld DK, Fiedler W. 2000. In vitro differentiation of endothelial cells from AC133-positive progenitor cells. *Blood* 95:3106-3112.
- Gill M, Dias S, Hattori K, Rivera ML, Hicklin D, Witte L, Girardi L, Yurt R, Himmel H, Rafii S. 2001. Vascular trauma induces rapid but transient mobilization of VEGFR-2⁺ AC133⁺ endothelial precursor cells. *Circ Res* 88:167-174.
- Kalka C, Masuda H, Takahashi T, Kalka-Moll WM, Silver M, Kearney M, Li T, Isner JM, Asahara T. 2000. Transplantation of ex vivo expanded endothelial progenitor cells for therapeutic neovascularization. *Proc Natl Acad Sci USA* 97:3422-3427.
- Lindvall O, Hagell P. 2001. Cell therapy and transplantation in Parkinson's disease. *Clin Chem Lab Med* 39:356-361.
- Mahooti S, Graesser D, Patil S, Newman P, Duncan G, Mak T, Madri JA. 2000. PECAM-1 (CD31) expression modulates bleeding time in vivo. *Am J Pathol* 157:75-81.
- Newman PJ. 1994. The role of PECAM-1 in vascular cell biology. *Ann NY Acad Sci* 714:165-174.
- Newman SL, Gootee L, Kidd C, Cirraolo GM, Morris R. 1997. Activation of human macrophage fungistatic activity against *Histoplasma*

- capsulatum upon adherence to type I collagen matrices. *J Immunol* 158:1779-1786.
- Nieda A, Nicol P, Denning-Kendall J, Sweetenham B, Bradley J. 1997. Endothelial cell precursors are normal components of human umbilical cord blood. *Br J Haematol* 1997:775-777.
- Peichev M, Naiyer AJ, Zhu Z, Lane WJ, Williams M, Oz MC, Hicklin DJ, Witte L, Moore MAS, Rafii S. 2000. Expression of VEGFR-2 and AC133 by circulating human CD34⁺ cells identifies a population of functional endothelial precursors. *Blood* 95:952-958.
- Prockop DJ. 1997. Marrow stromal cells as stem cells for nonhematopoietic tissues. *Science* 276:71-74.
- Punzel M, Ho AD. 2001. Divisional history and pluripotency of human hematopoietic stem cells. *Ann NY Acad Sci* 938:72-81. Discussion 81-72.
- Quirici N, Soligo D, Caneva L, Servide F, Bossolasco P, Delilieri GL. 2001. Differentiation and expansion of endothelial cells from human bone marrow CD133⁺ cells. *Br J Haematol* 115:186-194.
- Reyes M, Dudek A, Jahagirdar B, Koodie L, Marker PH, Verfaillie CM. 2002. Origin of endothelial progenitors in human postnatal bone marrow. *J Clin Invest* 109:337-346.
- Vaporciyan AA, Jones ML, Ward PA. 1993. Rapid analysis of leukocyte-endothelial adhesion. *J Immunol Methods* 159:93-100.
- Voyta JC, Via DP, Butterfield CE, Zetter BR. 1984. Identification and isolation of endothelial cells based on their increased uptake of acetylated-low density lipoprotein. *J Cell Biol* 99:2034-2040.
- Yamashita J, Itoh H, Hirashima M, Ogawa M, Nishikawa N, Yurugi T, Nakao K, Nishikawa S. 2000. Flk1-positive cells derived from embryonic stem cells serve as vascular progenitors. *Nature* 408:92-96.
- Yin AH, Miraglia S, Zanjani ED, Almeida-Porada G, Ogawa M, Leary AG, Olweus J, Kearney J, Buck DW. 1997. AC133, a novel marker for human hematopoietic stem and progenitor cells. *Blood* 90:5002-5012.
- Ziegler BL, Kanz L. 1998. Expansion of stem and progenitor cells. *Curr Opin Hematol* 5:434-440.
- Ziegler BL, Valtieri M, Porada GA, De Maria R, Muller R, Masella B, Gabbianelli M, Casella I, Pelosi E, Bock T, Zanjani ED, Peschle C. 1999. KDR receptor: A key marker defining hematopoietic stem cells. *Science* 285:1553-1558.

バイオ創薬におけるレギュラトリーサイエンスの新展開

早川 堯夫

Potential Role of Regulatory Science in the Development of Novel Biologics

Takao Hayakawa

バイオ創薬におけるレギュラトリーサイエンスの新展開

早川 堯夫

Potential Role of Regulatory Science in the Development of Novel Biologics

Takao Hayakawa

ヒトゲノム配列の解読が終了し、これを基に画期的医薬品や革新的医療技術の開発を目指す研究が急速に進展している。ポストゲノム時代における創薬には、大きく分けて2つのステージがある。第一のステージは、新たな遺伝子やタンパク質の探索とその機能解明である。その際のポイントは、いかに簡便、迅速、確実に新規遺伝子やタンパク質の探索とその機能解明ができるかである。第二のステージは、明らかにした遺伝子やタンパク質の機能に基づく創薬である。その際、機能が明らかにされた新たな遺伝子、タンパク質、関連機能分子あるいはそれらの改変体そのものが創薬ターゲット分子となり、新たなバイオ医薬品として開発されるケースが考えられる。一方、新たに機能解明された遺伝子やタンパク質を分子標的として、これらを制御することのできるものが創薬ターゲット分子となるケースも多い。いずれにしてもポイントは、その時点の科学技術の進歩をふまえ、いかに効果的に創薬ターゲットを見つけ、合理的で適切な品質、安全性、有効性に関する試験や評価を行うかにある。バイオ創薬分野でのレギュラトリーサイエンスの主要な役割は、関連する生命科学技術の所産を最も望ましい形で有用な医薬品として結実させ、効率よく臨床の場に届けられるようにすることにある。上記のステージのさまざまな過程において有用な物質の探索や特性解析、必要な技術や製品評価法の創出、あるいはそれらの有効活用を図ることなどにある。

1. ポストゲノム時代における創薬とレギュラトリーサイエンス

ゲノム解読から創薬・革新的医療技術への応用に至る流れの一部を図1に示した。

キーポイントは、遺伝子やタンパク質の機能を明らかにして、これに基づき、各種医薬品や医療技術への開発につなげていくということである。具体的には、明らかにした遺伝子やタンパク質の機能に基づいて、タンパク質を制御する低分子薬、タンパク質性の医薬品、抗体医薬品、遺伝子治療薬、細胞治療薬、さらには遺伝子を制御する核酸医薬品などの開発を目指すということである。いわゆる再生医療の場合には、幹細胞などから話がスタートすることもあるが、新規遺伝子で改変された細胞が活用されることも確実に多くなっていくと思われる。

ここで、レギュラトリーサイエンスの役割は、バイオ創薬のあらゆる過程において、科学技術の所産を最も望ましい形で、かつ迅速、効率的に医薬品や医療技術として臨床の場に届けられるようにすることにある。それには、①技術面、②物質面、③マネジメント面などから

の視点やアプローチがあるが、実際には、これらが相互に補完しあって目標を達成するということになる。別の表現をすれば、バイオ創薬の過程において、①技術面、②物質面、③マネジメント面などから、生命現象の解明や関連技術の進歩という科学技術の所産を最も望ましい形で、かつ迅速、効率的に医薬品や医療技術として臨床の場に届けられるようにするという目的を明確に意識し、かつ各々が担う個別の要素や活動が、医薬品や医療技術という諸科学の結晶に統合化される中でどのような位置づけにあるかを理解し、最も適正に統合化に寄与できることを目指したあらゆる科学的活動は、レギュラトリーサイエンスを体現するものであるといえる。この科学的活動の場は、行政に科学的根拠を提供し、行政を支援することを中心的役割とする公的な試験研究機関に必ずしも限らない。創薬に寄与する基礎研究や応用研究等を担う大学や優良な医薬品開発を目指す企業もまたその積極的な活動実践の場となることが期待される。その活動内容が、仮に一見、基礎研究や基礎研究、技術開発研究、あるいは製品開発研究といったもののように映ったとしても、その実践が明確に“より望ましいpublic health”を目指すものであること、医薬品や医療技術という諸科学の結晶を得るための科学的要素の統合化の過程を熟知し、その中で当該科学がどのような意義、位置づけにあるかを把握した上で、目標達成や統合化に向けてどのよ

本稿は、第123年会 日本薬学会でのレギュラトリーサイエンス部会創立関連ミニシンポジウム「レギュラトリーサイエンスはバイオ創薬の推進力になるか」における講演「レギュラトリーサイエンスの新展開」を要約加筆したものである。

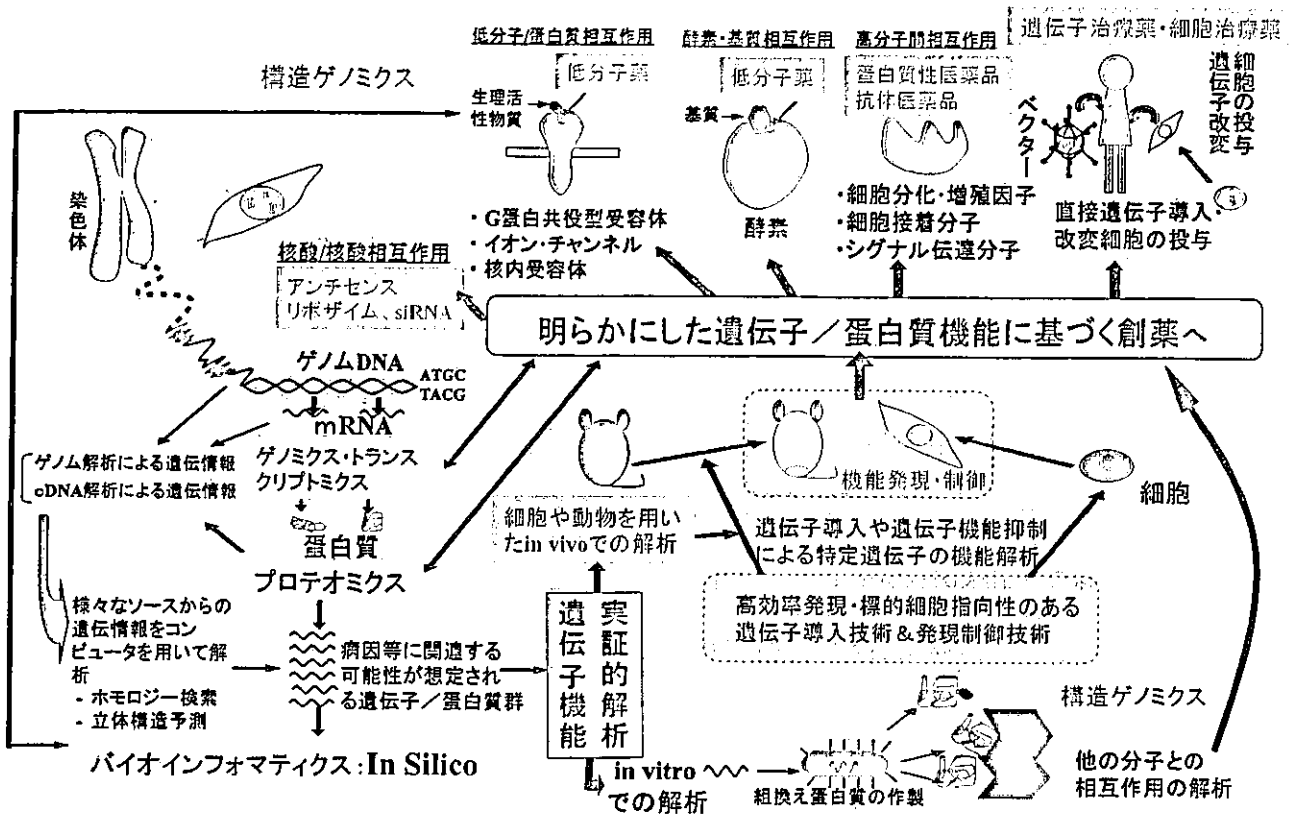


図1 ゲノム解釈から創薬・革新的医療技術への応用

うにさらなる展開をすべきかの展望を明確に有している限り、レギュラトリーサイエンスの実践であるといえる。もとより、国立衛研が、そうした活動の中核を担うべきことは言うまでもない。

本稿では、1) 技術面の展開として、バイオ創薬の適正な推進に必要な新技術の開発、評価、有効活用、2) 物質面からみた視点として、創薬ターゲットの探索や特性解析と評価の密接な関係づけ、3) マネージメント面からの視点として安全性・有効性の予測や設計の重要性及びトランスレーショナルリサーチの推進などに関して国立衛研で取り組んできた活動を中心にレギュラトリーサイエンスの新たな展開や役割について述べる。

2. 技術面の展開：バイオ創薬の適正な推進に必要な新技術の開発、評価、有効活用

ポストゲノム時代における創薬に用いられる技術基盤と要素を図2に示した。

大きく分けて2つのステージがある。新たな遺伝子やタンパク質の探索とその機能解明という第1のステージと明らかにした遺伝子やタンパク質の機能の活用や制御に基づく創薬、すなわち創薬ターゲットの探索、選択と最適化、製造方法の検討、品質・有効性・安全性評価という第2のステージである。各ステージでは、従来用いられてきた創薬関連技術に加え、各種「ゲノミクス」

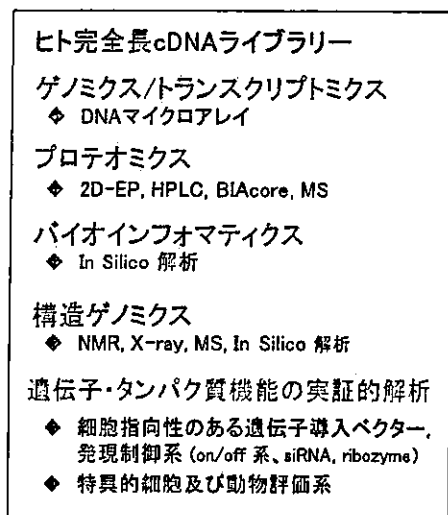
「プロテオミクス」、「バイオインフォマティクス」、及び「遺伝子・タンパク質機能の実証的解析技術」などの新技術が用いられるが、これらの技術を“いかに評価し、有効に活用するか、いかに技術的に進化させ活用するか”が、開発をスムーズに進行させ、創薬ターゲットの適正な評価に繋がるかを定めるキーポイントになると思われる。この中で、特に「遺伝子・タンパク質機能の実証的解析技術」が大きなポイントと思われるので、まずこの点を取り上げる。

2.1 遺伝子・タンパク質機能の実証的解析技術

バイオ創薬の第一ステージである遺伝子やタンパク質機能解明については、「ゲノミクス」、「プロテオミクス」、「構造ゲノミクス」、「バイオインフォマティクス」などの包括的・網羅的な研究展開が行われているが、これだけでは絞り込み、推定はできても遺伝子機能を最終的に実証し、医薬品開発や医療技術への応用にもっていくことはできない。絞り込まれた、「個別遺伝子の機能を実証的に解析する」必要がある。その際の実証的解析の手段のひとつは、“標的細胞や動物に候補遺伝子(群)を導入して発現させ、その機能を直接評価するか、あるいは生体系で機能している特定の遺伝子機能を抑制することにより逆に標的遺伝子機能を評価するという実証的解析”である。しかし、ゲノミクス、プロテオミクス、*in silico*

第1ステージ

新規遺伝子やタンパク質の探索及び機能解明



第2ステージ

明らかにした遺伝子/タンパク質の機能の活用や制御に基づく創薬

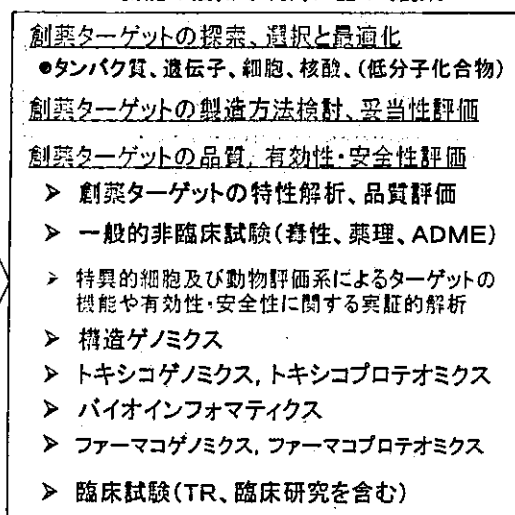


図2 ポストゲノム時代の創薬における2つのステージと技術基盤

等の急速な進展に比べて、実証的解析系の開発は極めて遅れている。

これは画期的な遺伝子導入技術と発現制御技術及び評価系の開発が遅れているためである。したがって、この分野のブレークスルーは、遺伝子機能解明研究にとって、非常に重要であると考えられる。

2.2 画期的遺伝子導入技術が充たすべき基本的条件

画期的遺伝子導入技術が充たすべき基本的条件としては、①遺伝子機能に関するスクリーニングにスピードが決定的要素であることを考慮すれば、簡便・迅速に目的遺伝子を組み込んだ導入系が構築できること、②目的遺伝子が核内に高効率で導入され、かつ目的遺伝子産物を高発現すること、③各種細胞(非分裂細胞や初代培養細胞を含む)や動物に高効率で目的遺伝子を導入できること、④標的細胞指向性の制御が可能なことなどが重要である。また、画期的遺伝子導入技術として開発が期待されるものとしては、⑤細胞内において複数のタンパク質を同時発現させ、共同作用や相互作用を伴う機能を解明するために、複数の目的遺伝子が導入可能な遺伝子導入系の作製技術、⑥特定の遺伝子発現産物の用量-反応をみながら機能解析ができるよう、目的遺伝子の発現程度を調節可能な遺伝子導入系の作製技術、⑦細胞の本来の遺伝情報系の機能を傷害することなく、目的遺伝子産物の機能を長期にわたり観察することを可能にする、染色体外で安定発現可能な遺伝子導入系の開発、⑧細胞分裂を伴っても目的遺伝子産物の機能を長期にわたり観察することを可能にし、かつ他の遺伝子に影響を及ぼさず特定の染色体の特定部位への目的遺伝子組み込みを可能と

する技術の開発などが挙げられる。

2.3 簡便・迅速な遺伝子導入系の作製技術

画期的遺伝子導入技術開発を行うため、筆者らは既存するベクター中では最も遺伝子発現効率が高く、プラスミドDNAと比較すると、10の5乗から8乗倍も効率が良いとされるアデノウイルスベクター(Adベクター)をベースに研究を進めている。Adベクターの問題は、目的遺伝子を組み込むのに、きわめて煩雑な手順と何ヶ月という期間を要することであった。この問題に関しては幸いなことに筆者らは、既に革新的ともいべき独自の「簡便・迅速な遺伝子導入系の作製技術」を開発し、自家薬籠中のものとしていた。そのポイントはAdベクターをプラスミドベクターとして扱う点であり、目的外来遺伝子を挿入するサイトに特異的な制限酵素部位を入れたAdベクターバックボーンを作製しておいて、目的外来遺伝子を含むプラスミドとのワンステップの*in vitro*ライゲーションで迅速、簡便に遺伝子導入コンストラクトを作製する、ということである。その1例を図3に示した¹⁾。

2.4 汎用性又は特定標的細胞指向性の制御が可能な遺伝子導入構成体の作製技術開発

次の大きな課題は、汎用性又は特定標的細胞指向性の制御が可能な遺伝子導入構成体の、作製技術開発である。既存で汎用されるAdベクター5型は、そのファイバー部分がCAR (coxsackievirus-adenovirus receptor) と呼ばれるレセプターを介して細胞に入っていくことが知られている。したがって、Adベクターの標的細胞指

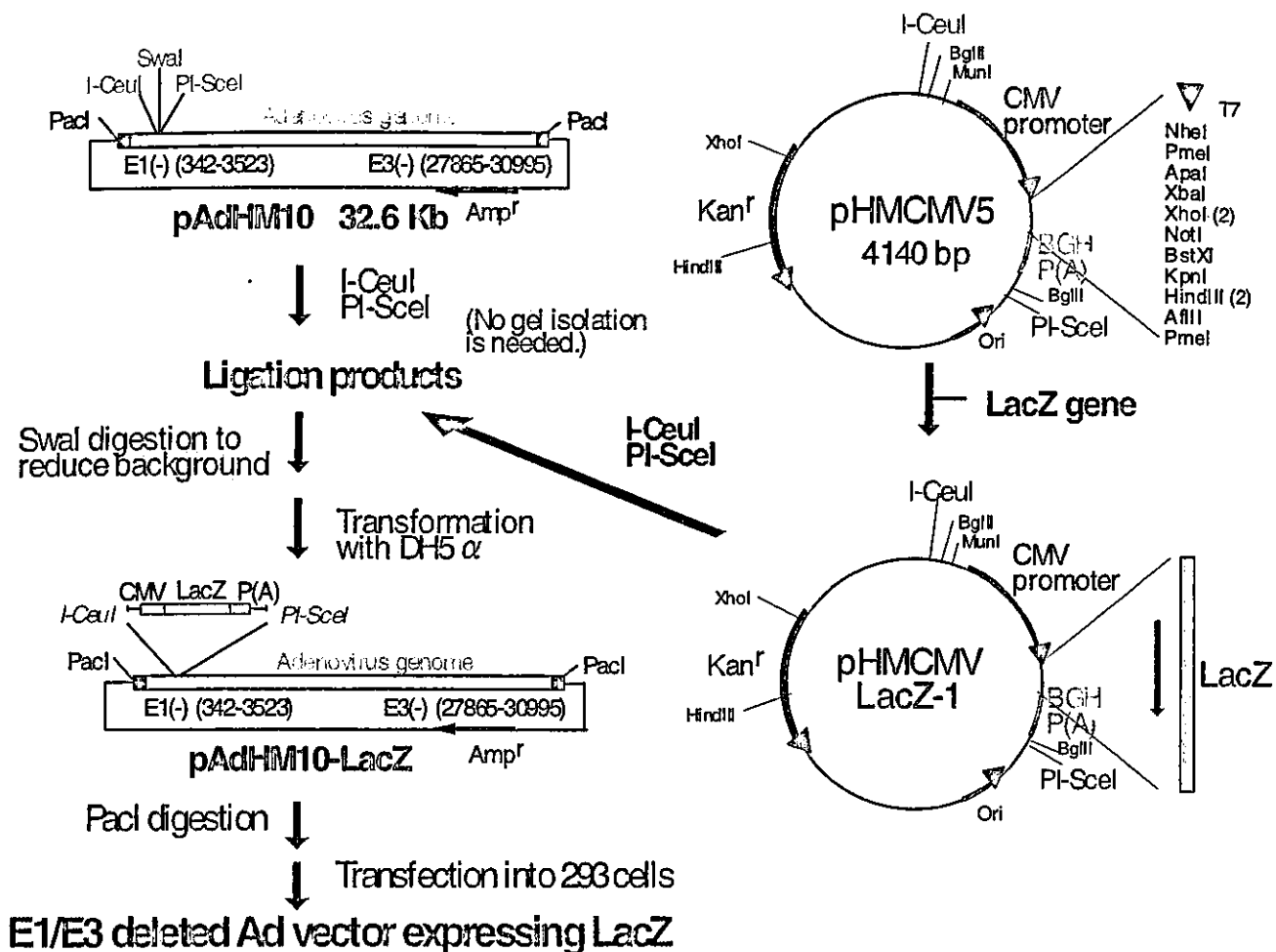


図3 ワンステップの *in vitro* ライゲーションに基づいたアデノウイルスベクター作製法

向性を制御するための大きなポイントの一つは、このファイバー部分の改変にあると考えた。そこで、例えば細胞表面のインテグリンを標的とするリガンドである RGD あるいはヘパラン硫酸を標的とするポリリジンペプチドでファイバー部分を改変した Ad ベクターを作製する技術開発を試みた。

その結果、図4の第1段階に示したように、CAR との結合に与るファイバータンパク質をコードする遺伝子配列部分に、挿入したい任意の外来ペプチド、ここでは RGD に相当するオリゴDNA を、ワンステップの *in vitro* ライゲーションでベクター DNA に導入し、ファイバーを改変する技術を開発した²⁾。本技術は、図4の第2段階に示した E1 欠損領域へのワンステップの目的外来遺伝子挿入技術とのセットで、極めて簡便に任意の細胞特異性を有するベクターの構築を可能にする。換言すれば、標的細胞指向性の制御を可能にする画期的なものである。

RGD 配列をファイバーに導入した Ad-RGD ベクターを、従来型ベクターと比較すると、CAR の発現が乏しいヒトやマウスの細胞では、100-1000 倍の遺伝子導入活性を示した (図5)^{2,3)}。また、ヘパラン硫酸を標的と

するポリリジンペプチドでファイバー部分を改変した Ad ベクターでは、ヒトやマウスの細胞での遺伝子発現を 100 倍以上増加させることができた⁴⁾。

次に、従来用いられてきた Ad 5 型ベクターに代わり、Ad 35 型を用いればどのような性質の変化が現れるかという点に着目して、5 型 (Ad5L) に Ad 35 型のファイバーをつけたもの (Ad5F35L)、Ad 35 型そのもの (Ad35L) をベクタープラスミドとして構築して、その標的細胞指向性などについて検討してみた。その結果、Ad 35 型はとくに顕著に CD 34 陽性細胞への標的指向性があるというデータが得られた (図6)^{5,6)}。

このように標的細胞指向性を自在にかつ迅速に変えられる遺伝子導入技術基盤がわが国独自に開発され、確立したことは、遺伝子機能解明にとって画期的であるばかりでなく、その技術の汎用性と応用面での広がりを見ると大きな意義を持つと思われる。

2.5 複数の目的遺伝子を搭載した遺伝子導入構成体の作製技術開発

複数の目的遺伝子を搭載した遺伝子導入構成体の作製

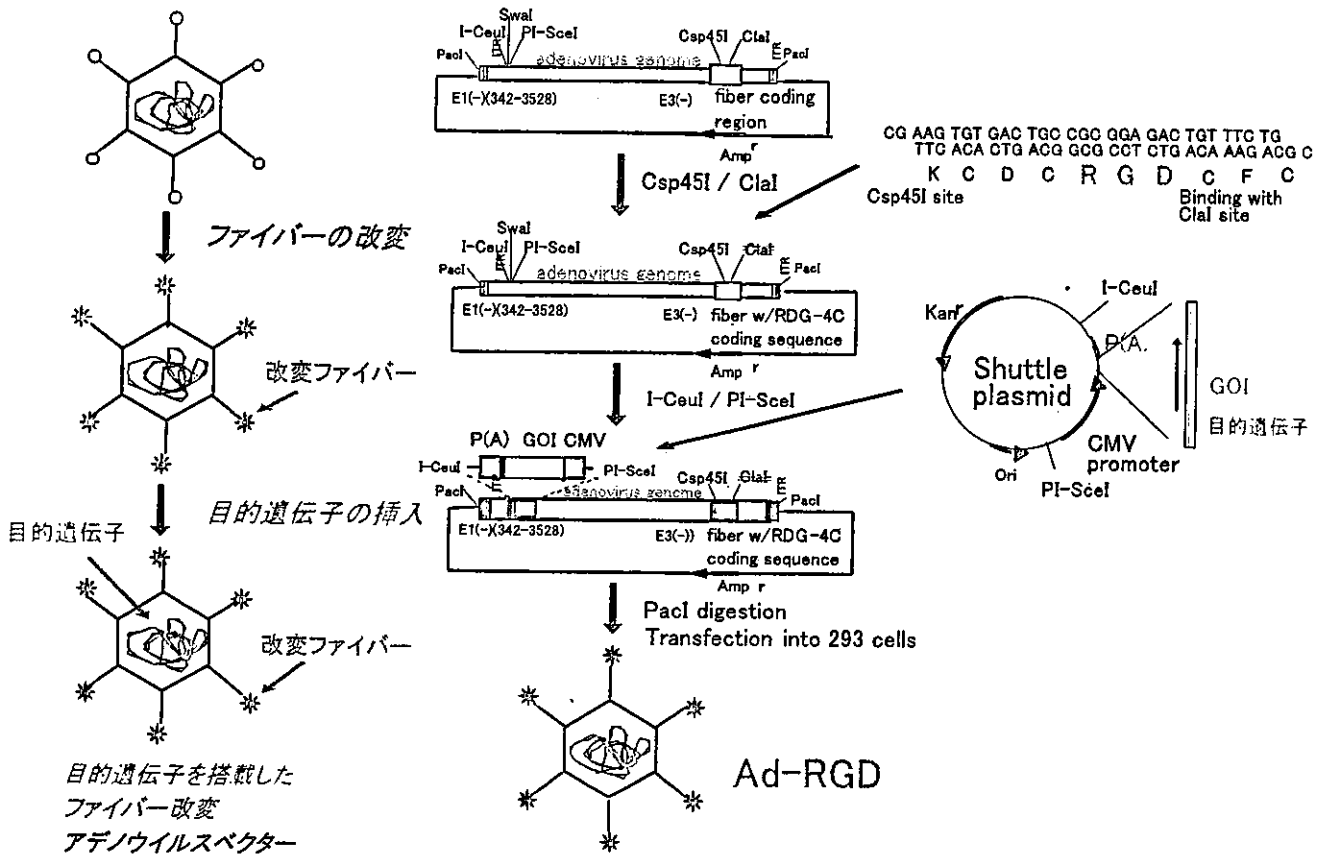


図4 標的細胞指向性を制御できるアデノウイルスベクターの開発

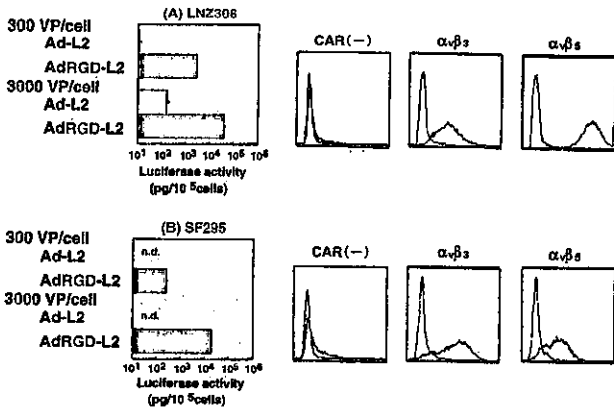


図5 RGD配列をファイバーに付与したアデノウイルスベクターによるCAR (-)細胞への遺伝子導入活性の増強

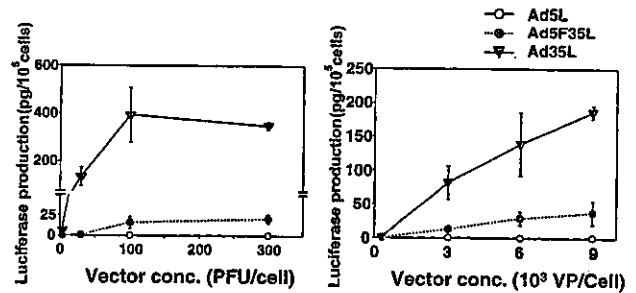
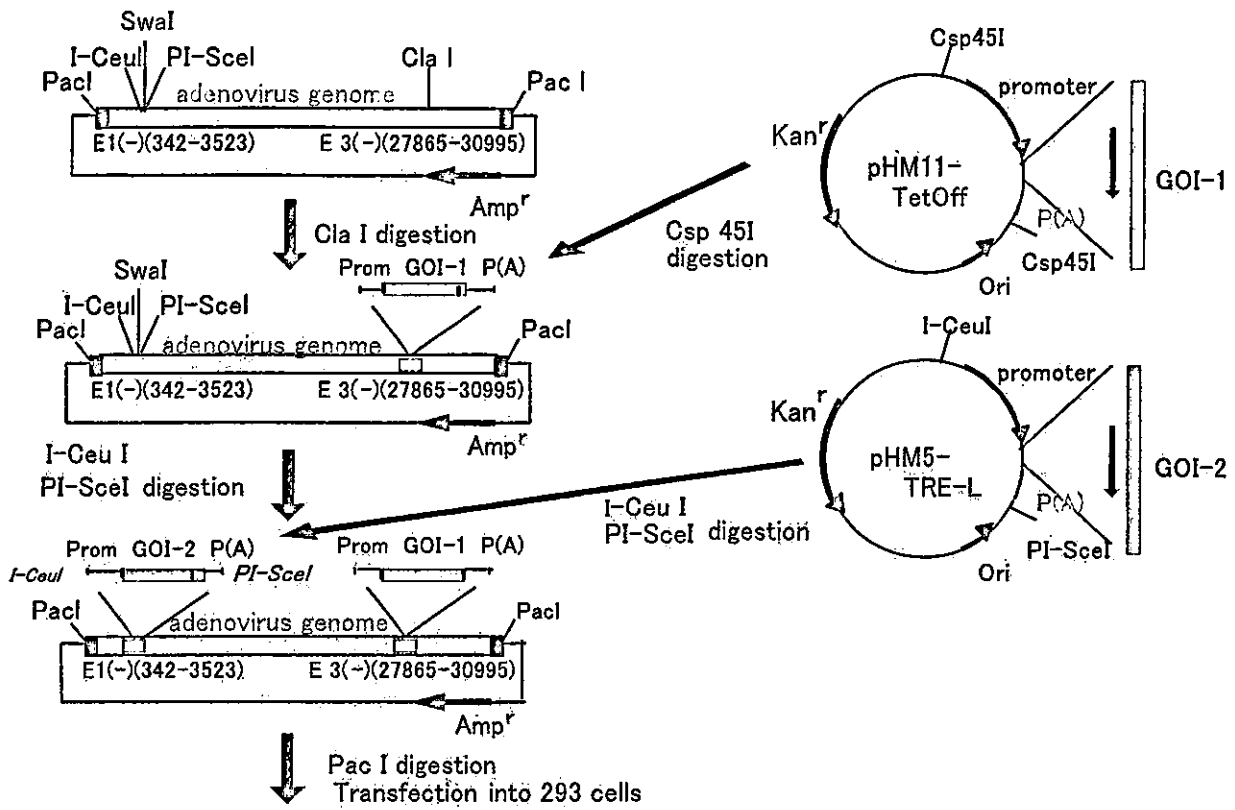


図6 35型アデノウイルスベクターによるヒトCD34陽性細胞への遺伝子導入活性の増強

技術が開発されると、1) 目的遺伝子の発現制御、2) 遺伝子機能の定量的解析、3) 複数の遺伝子を同時発現させて共同作業や相互作用を伴うタンパク質の機能解析が可能になると期待される。

検討の結果、図7に示すように、AdベクタープラスミドのE1及びE3欠損部位にそれぞれユニークな制限酵素サイトを導入したベクターバックボーンを基に、ワンステップの*in vitro*ライゲーションで単一のベクター内に複数の外来遺伝子 (GOI-1, GOI-2) を導入できる簡

便なAdベクター作製システムの開発に成功した⁷⁾。この作製法を利用して、一方に、目的遺伝子とテトラサイクリン応答性のプロモータ、他方に、転写活性化遺伝子を搭載して、ドキシサイクリンで用量依存的に発現をoffにしたり、onにできるシステムの構築にも成功した(図8)^{8,9)}。onシステムでは、3番目の調節的遺伝子配列導入により、最高2500倍にわたる制御が可能になったという例を示している¹⁰⁾。これは*in vitro*での例であるが、*in vivo*でもこのシステムはきちんと機能することを確かめた。すなわち、Tet-offシステムではドキシサイクリン摂取に伴う顕著な発現抑制、Tet-onシステムでは摂取に伴う顕著な発現上昇と中止による減少が認めら



単一のベクター内に複数の外来遺伝子を搭載した
アデノウイルスベクター

図7 単一のベクター内に複数の外来遺伝子を搭載したアデノウイルスベクターの開発

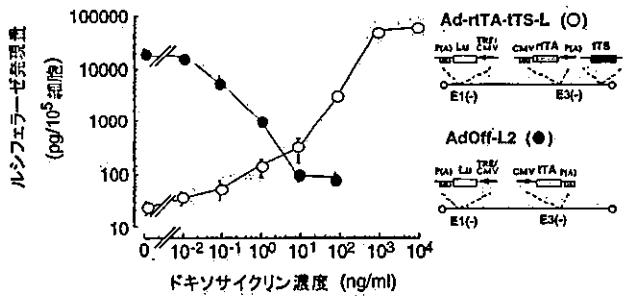


図8 発現制御型アデノウイルスベクターを導入したSK HEP-1細胞における遺伝子発現の制御

れた (図9)¹⁰⁾.

2.6 成熟した細胞内や動物体内ですでに機能している
特定遺伝子の機能発現を制御することにより標的
遺伝子機能を評価し、遺伝子やタンパク機能を解
明する技術開発

“成熟した細胞内や動物体内ですでに機能している特定遺伝子の機能発現を制御することにより逆に標的遺伝子機能を評価し、遺伝子やタンパク機能を解明する”というアプローチも考えられる。図10には、21塩基対からなる2本鎖RNA (siRNA) が配列特異的に細胞内の特

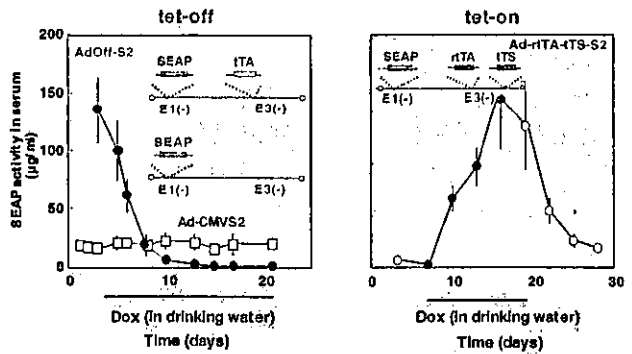


図9 tet-offあるいはtet-onシステムを搭載したアデノウイルスベクターによるマウスでの遺伝子発現制御

定のmRNAの分解を促進して遺伝子発現を阻害するという現象を利用して、Adベクターに搭載したルシフェラーゼに対するsiRNAにそのような作用を期待できるかどうかみだ結果を示しているが、ルシフェラーゼの遺伝子発現を阻害することが示された (投稿準備中)。

2.7 新規遺伝子やタンパク質の探索や機能解析手法は、
評価手法に繋がる

ここで注目すべきことは、上記に述べたような新規遺伝子やタンパク質の探索や機能解析手法の開発は、評価

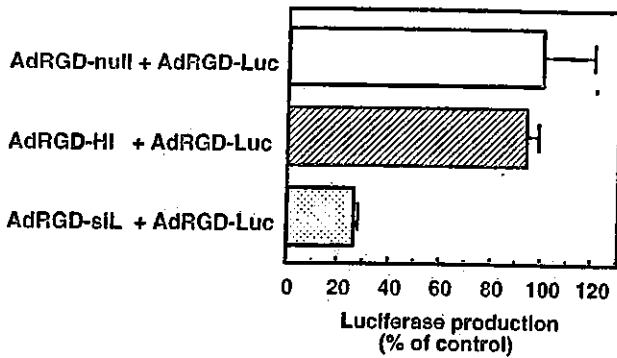


図10 siRNA発現アデノウイルスベクターによる遺伝子発現の抑制

手法の開発にも繋がるということである。すなわち、①成熟した細胞や動物個体での特定の遺伝子やタンパク質の発現あるいは機能発現抑制状態を簡便・迅速に創出する技術は、②任意の外來性の遺伝子やタンパク質を任意な程度に発現したり、内因性の遺伝子発現が抑制された細胞や動物（トランスジェニック/ノックダウン動物・細胞）あるいは疾患モデル動物の作製、という医薬品開発のための新たな評価系を作り出すことにも繋がることと期待される。

レギュラトリーサイエンスの役割の一つには、バイオ創薬の適正な推進に必要な新技術をいかに開発し、評価し、適正に位置づけていかに有効に活用していくか、ということがある。画期的遺伝子導入技術をそうした目でみると、機能の実証的解析、評価系作製ということに加えて、有効性、安全性の高い遺伝子治療用ベクター作製や細胞治療薬の創製の基盤とすること、さらには、プロテオミクスやゲノミクスとの双方向的解析によって、ある特定の遺伝子やタンパク質が他の遺伝子やタンパク質の発現に与える影響あるいは相互作用の解明、などに活用できるようにしていくことが重要であると思われる(図11)。

3. 物質面からみた視点：創薬ターゲットの探索や特性解析と評価の密接な関係づけ

バイオ創薬推進のもう一つの鍵は、創薬ターゲットの物質面でのバリデーション（創薬ターゲットの探索、選択と最適化、特性・品質・安全性等の実証的解析や評価）にあるが、レギュラトリーサイエンスとしては、その内容や手法は医薬品としての評価や評価手法に直接繋がる場合が多いという視点に立つことが重要である。

3.1 創薬ターゲットの探索のためのプロテオミクス/グライコミクス

現在、疾患関連プロテオームファクトリーというプロジェクトがスタートしようとしている。これは、高血圧、がん、痴呆症、喘息などの疾患や薬物等で変動するタン

パク質を探索、同定し、画期的医薬品のシーズとして活用するというものである。このプロジェクトそのものについては、計画を煮詰める段階にあるので、今後の展開に期待するとして、そのモデルとして衛研で始めたアプローチの一つの原理について紹介する¹¹⁾。

起源の異なる2つの試料A及びB（例えば病態細胞や組織及び正常なもの）由来の糖タンパク質から、図12に示すような手順で得られた糖鎖を誘導体化、この場合はピリジルアミノ化(PA化)する。この際、一方を重水素置換されたPAで誘導体化して分子量が4Da大きい糖鎖とする。この二つの糖鎖を混合して、LC/MSを用いて糖鎖のプロファイルを作成する。マススペクトル上、4Da異なる一対のイオンがみつければ、それらは共通にある糖鎖であり、どちらか一方のイオンしか検出されない場合は、それは疾患の原因か結果に関連する糖鎖のイオンとみなして、さらにこれが、どのようなタンパク質に由来するのかを明らかにしていくという戦略である。この際、ペプチドを適当な試薬で標識化して解析するというアプローチも考えられる。

このような原理に基づいた結果の一例を図13及び図14に示す。囲みの中がmixtureの糖プロファイルであるが、この中で同位体の質量差分だけ異なる一対のイオンが検出されないもの、すなわち、いずれが一方にしか存在しない糖鎖の例として、ピーク1, 2, 3のマススペクトルを示す。ピーク1からはm/z942の混成型糖鎖、ピ

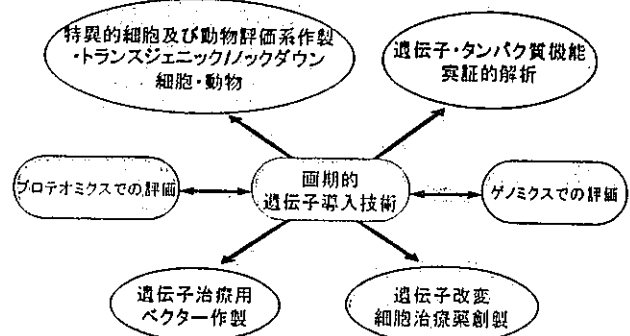


図11 画期的遺伝子導入技術はさまざまな局面で有効活用される基盤技術である

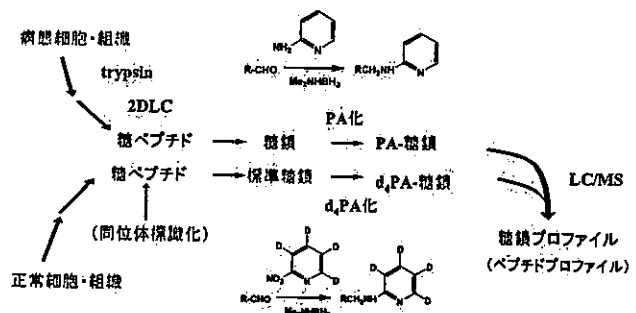


図12 同位体標識化とLC/MSを用いたプロテオミクス・グライコミクス

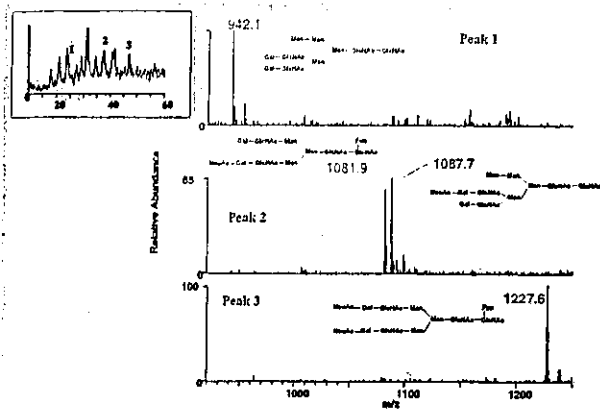


図13

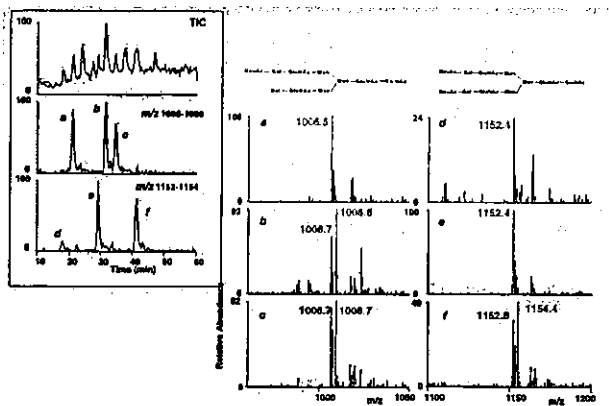


図14

ーク2からは、1081の試料B由来のプロシルモノシアロ複合型と1087の試料A由来のモノシアロ2本鎖糖鎖、ピーク3は1227の試料B由来のプロシルジシアロ2本鎖糖鎖が検出された。すなわちピーク1から1つ、ピーク2から2つ、ピーク3から1つ、いずれか一方にしか存在しない糖鎖が検出されたということになる(図13)。

さらに詳細に解析すると違いが見えてくるものもある。例えばm/z1006-1008(モノシアロ2本鎖糖鎖の2価イオン)のマスキングマトグラムをみると、3つの異性体(a, b, c)が存在するが、そのうち、異性体aは一方に特有の糖鎖であることがわかる。同様にm/z1152-1154(ジシアロ2本鎖糖鎖)についても異性体d, eが一方に特有の糖鎖であることがわかる(図14)。

一方のイオンしか検出されないものは、疾患の原因が結果に関連する糖鎖のイオンとみなしてさらに検討を進めることになる。糖タンパク質の解析については、国立衛研において独自に積み上げてきた技術的成果が数多くある¹¹⁻²²⁾。それらの蓄積を今後、検討対象となった糖タンパク質の構造と機能の解析手段としていかに活用していくか、必要に応じてさらに適切な解析法をいかに開発していくかが重要な課題になると考えられる。

3.2 創薬ターゲットの特性解析と評価のためのプロテオミクス/グライコミクス

一方、上記のような分析法は、糖タンパク質性医薬品の特性解析・品質評価にも応用することができる。そのようなスキームで糖鎖プロファイルを作成すると、各ピークのマスマスペクトルから、試料やコントロール由来の糖鎖の種類や含量を明らかにすることができるので、糖鎖のcomparabilityや確認試験、あるいは恒常性を評価するのに有用な手段とすることができるということである(図15)。

3.3 細胞特性解析プロテオミクスと特性指標

図16には、細胞特性解析プロテオミクスの例を示す。肝臓の再生に使われると考えられる肝幹細胞として注目されている小型肝細胞と肝細胞について2次元電気泳動とTOF-MS等による解析を行い、小型肝細胞にアネキシンⅢが特異的に発現していることを見いだした²³⁾。このようなタンパクプロファイルや、特性指標としてのアネキシンⅢに着目することが、同時に肝幹細胞の特性評価や品質等を確保する上で有用であるという視点を持つことが重要ということである。

3.4 プロテオミクス展望

プロテオミクスは、生体系のプレーヤーとしてのタンパク質群にスポットをあてた解析手法として、図17に示すように新規タンパク質の探索から創薬分子ターゲットの選択、最適化や創薬候補物質の薬効・安全性評価などを含むR&Dのさまざまな段階、バイオアッセイなど品質評価や管理のさまざまな局面、薬効判定や作用・副作用のモニターをはじめ臨床評価に関わるさまざまな局面に共通した最も基盤的な技術の一つになっていくと思われる。レギュラトリーサイエンスとしては、そうした視点でこれらをいかに効果的に活用するかをさらに研究していく必要がある。

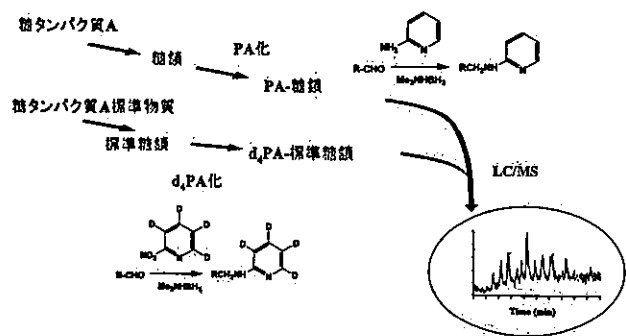
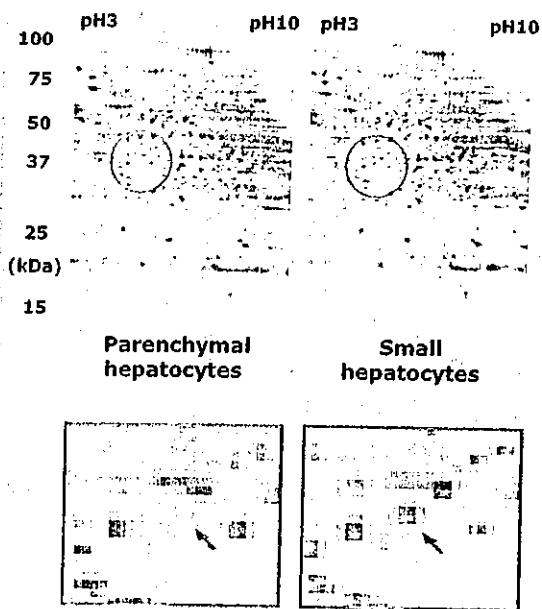
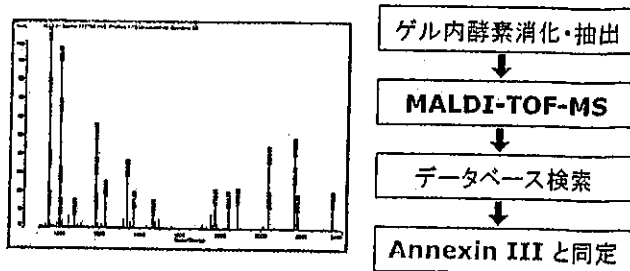


図15 PA同位体標識化とLC/MSを用いた糖鎖プロファイリング法糖タンパク質性医薬品特性解析・品質評価法への応用

2次元電気泳動による比較



MALDI-TOF-MSによる質量スペクトルの測定



ウエスタンブロットによる確認

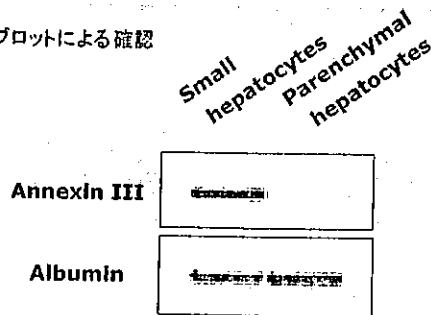


図16 小型肝細胞の特性指標の探索と特性・品質評価法への応用

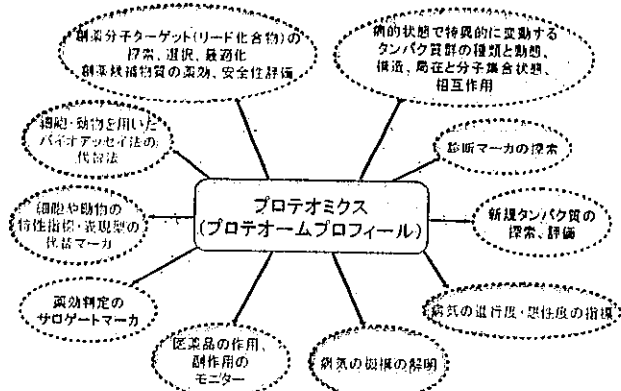


図17 プロテオミクス展望

ス試験とその解析・評価が重要ということである。さらに、適切なウイルスクリアランス工程評価試験のようなコンセプト(図19)と実践も安全性予測や設計としては重要である²⁴⁻²⁷⁾。

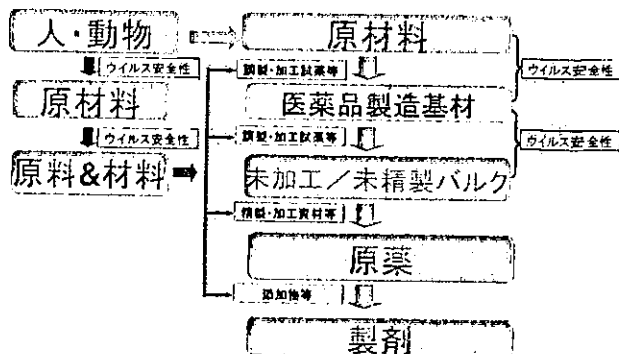


図18 人・動物由来原材料/製品が関係する医薬品製造のウイルス安全性

4. マネージメント面からみたレギュラトリーサイエンスの役割

4.1 周到な安全性・有効性の予測や設計：ウイルス安全性

周到な安全性・有効性の予測や設計に関わることもレギュラトリーサイエンスの重要な役割である。そのことが製品レベルでの合理的で効率的な評価や安全性・有効性確保に繋がるからである。

その一つの例が、ウイルス安全性で、上流の適切な段階で安全性予測や設計をきちんとやればやるほど、製品レベルの評価や安全性確保が合理的で効率的にできるということである。具体的には、例えば、図18に示すように原材料及び人や動物の適格性の評価、そして医薬品の製造基材と定めた段階のものにおける徹底的なウイル

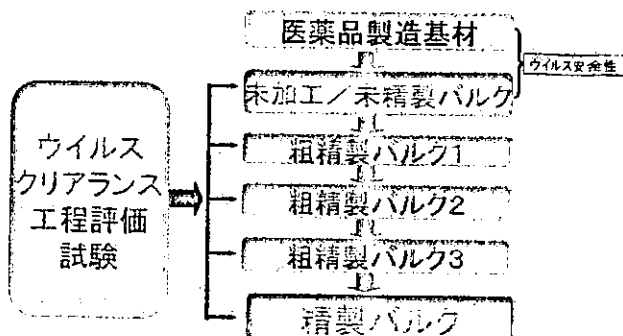


図19 ウイルスクリアランス工程評価試験

と同時に、レギュラトリーサイエンスとしては、ウイルス検出の高感度化など、さらに安全性を高める技術の開発も重要である。

最近、筆者らは、ポリエチレンイミン結合磁気ビーズ及びスルホン酸磁気ビーズを用いたウイルス濃縮とPCRを組み合わせた、各種ウイルス検出の高感度化にきわめて有効であるという結果を得ている(図20)^{28, 29}。図21は、複数のウイルスが存在している試料を、磁気ビーズで10倍、100倍と濃縮すると、その度合いに応じて、検出感度が10倍あるいは100倍以上と上昇することを示したものである。表1は、各種のウイルスに試した結果で、いずれかのビーズを用いることにより、特にヒトで問題となるHBV, HCV, HIVを含む検討した全てのウイルスが濃縮可能で高感度に検出できることが明らかに

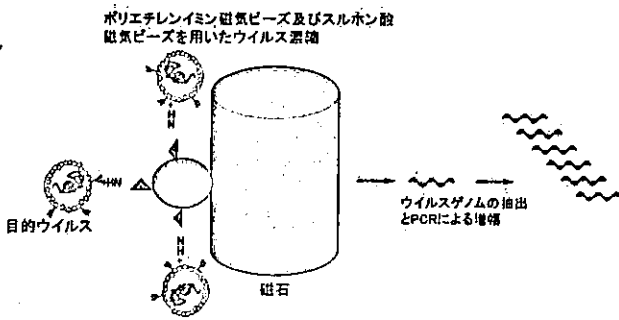


図20 ウイルス濃縮とPCRを組合わせたウイルス検出の高感度化

なった。さらに、図22のように従来の細胞変性法に変わって、感染性ウイルスをPCRで測定するという迅速、

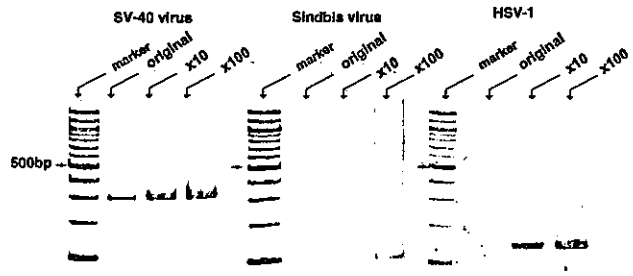


図21 3種混合ウイルスのPEIによる濃縮

表1 ウイルス濃縮結果

ウイルス	宿主	ウイルスゲノム	増殖期	ポリエチレンイミン磁気ビーズ	スルホン酸磁気ビーズ
ヘルペスウイルス1型	ヒト	DNA	有	+	+
ポリオウイルス	ヒト	RNA	無	-	+
ブタバロウイルス	ブタ	DNA	無	-	+
水痘性口内炎ウイルス	ウシ	RNA	有	+	+
Sindbis ウイルス	ヒト	RNA	有	+	+
SV-40ウイルス	サル	DNA	無	+	+
サイトメガロウイルス	サル	DNA	有	+	ND
マウス白血病ウイルス	マウス	RNA	有	+	ND
アデノウイルス	ヒト	DNA	短	+	+
HBV	ヒト	DNA	有	+	+
HCV	ヒト	RNA	有	+	ND
HIV	ヒト	RNA	有	+	+
HAV	ヒト	RNA	無	-	+

<Classical Cell culture/CPE method>

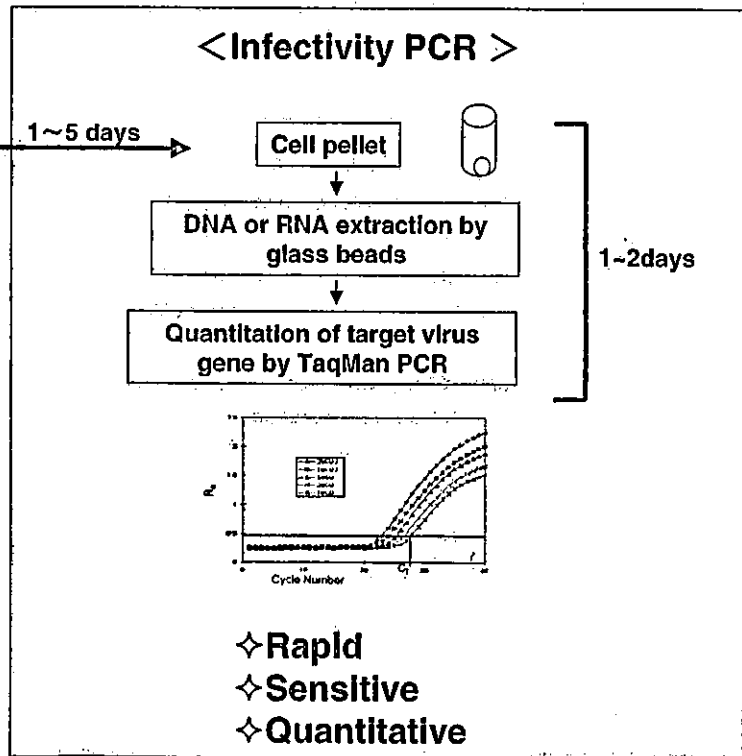
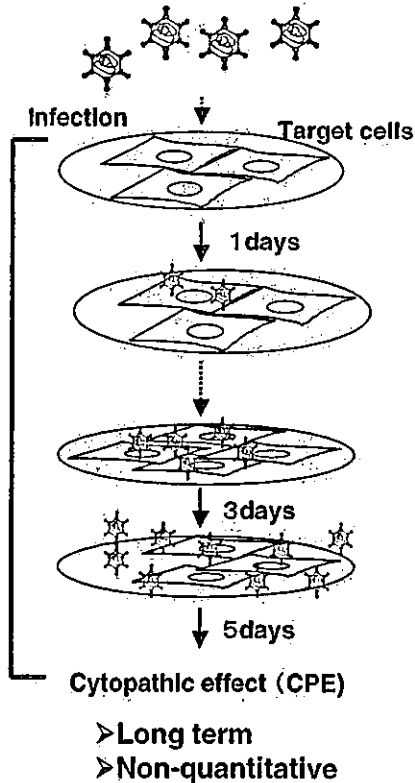


図22 細胞変性を指標としたウイルス感染性の測定と感染性PCR

高感度及び定量的な手法の開発にも成功している。表2は結果の一例で、感染性PCRを利用することにより1pfuという非常に高感度でウイルスの感染性を迅速に検出することが可能であることを示したものである³⁰⁾。感染性PCRを利用したウイルス感染性の検出は、HSV、ポリオウイルス、バルボウイルスなどのモデルウイルスについても適応可能であることを確認している。

4.2 周到な安全性・有効性の予測や設計：遺伝子治療用ベクター

遺伝子治療薬は、有効性・安全性面からみてまだ多くの課題を残しており、医薬品として一般的に実用化できる段階に至るまで技術がブレークスルーできていない。

表2 細胞変性法及び感染性PCRによるアデノウイルスの検出
Number of CPE or E1 DNA positive samples prepared from HeLa cells infected with Adenovirus (n=3)

<CPE method>					<Infectivity PCR >				
pfu/dish	Day1	Day3	Day6	Day9	pfu/dish	Day1	Day3	Day6	Day9
10000	0/3	0/3	0/3	0/3	10000	0/3	0/3	0/3	0/3
1000	0/3	0/3	0/3	0/3	1000	0/3	0/3	0/3	0/3
100	0/3	0/3	0/3	0/3	100	0/3	0/3	0/3	0/3
10	0/3	0/3	0/3	0/3	10	0/3	0/3	0/3	0/3
1	0/3	0/3	0/3	0/3	1	0/3	0/3	0/3	0/3
0.1	0/3	0/3	0/3	0/3	0.1	0/3	0/3	0/3	0/3
0	0/3	0/3	0/3	0/3	0	0/3	0/3	0/3	0/3

Lower particle number of Adenovirus can be detected in earlier days by infectivity PCR.

しかし、適切なベクターが一端開発されれば、目的遺伝子を搭載するだけで医薬品ができるという特異なバイオ創薬分野である。

そのために最も重要なことは、すでに判明している有効性・安全性に関する問題を克服するための設計図の作成とその実現である。図23には、アデノウイルスベクターの短所を克服して新世代ベクターに至るための設計図の例を示している³¹⁾。

改良の第一歩として、Adベクターの標的細胞指向性を変えることによって、担癌動物腫瘍内の遺伝子発現活性や腫瘍増殖抑制効果の顕著な増大を示す一方で、肝臓への漏れ、指向性は逆に減少するというデータが得られている³²⁾ (図24)。すなわち、Ad受容体発現が乏しいB16メラノーマ担癌マウスの腫瘍内への投与において、腫瘍内での遺伝子発現活性は従来型Adベクターの約40倍に増加し、逆に肝臓への漏れ、指向性は、1/8に減少していた。また、自殺遺伝子 (HSVtk) 搭載ベクター投与とGCV投与において、Ad-RGDベクターは顕著な腫瘍増殖抑制効果を示した。また、従来型Adベクターでは遺伝子導入が困難であったヒト正常樹状細胞において、標的細胞指向性を変えたAd-RGDベクターが約90%の遺伝子導入を達成できること、また、遺伝子発現効率が飛躍的 (約70倍) に向上するというデータ^{33,34)} (図25) や、Ad-RGDベクターを用いると、樹状細胞に

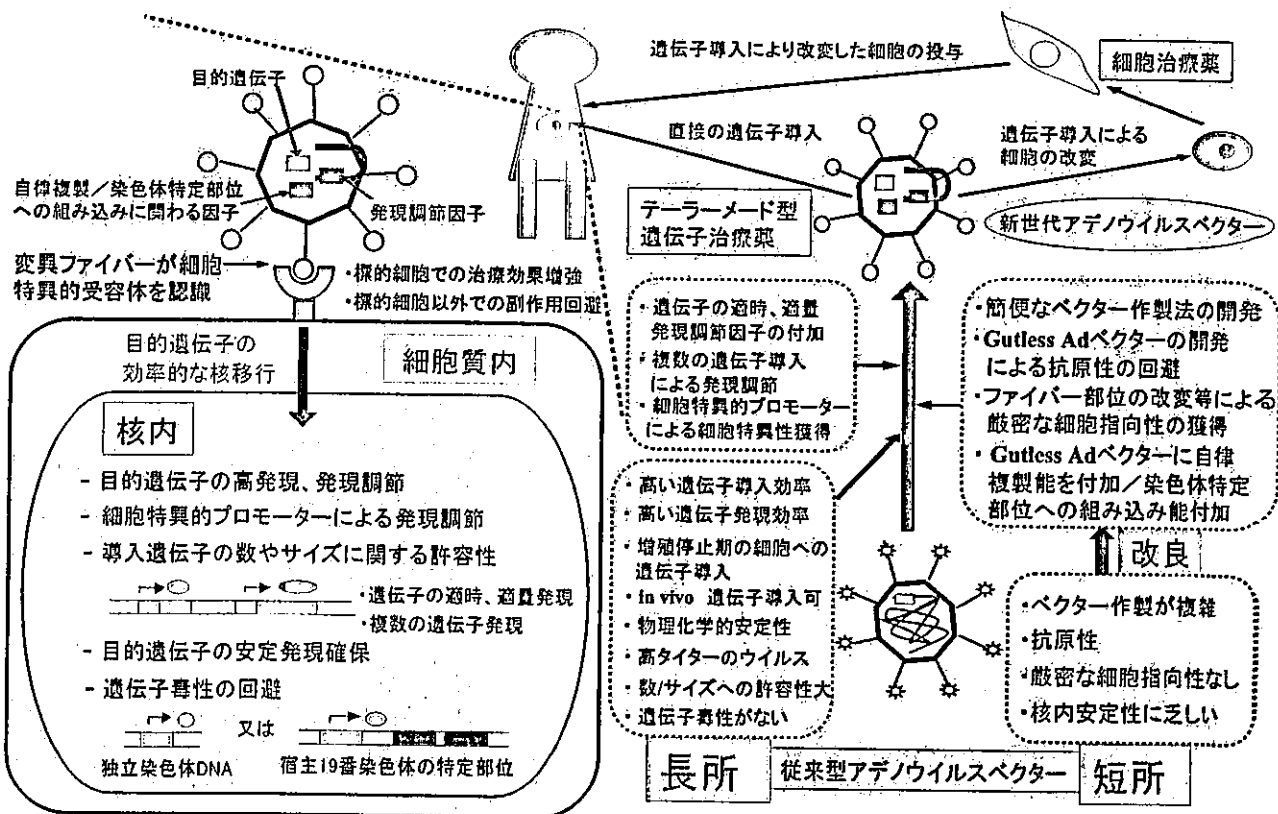


図23 新世代アデノウイルスベクターの開発

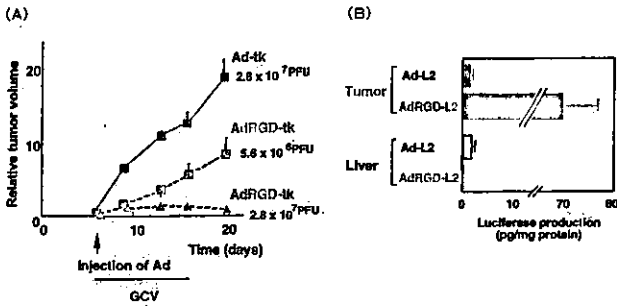


図24 RGD配列を付与した自殺遺伝子 (HSVtk) 発現アデノウイルスベクターによる抗腫瘍効果の増長 (A) と癌組織及び肝臓での遺伝子発現 (B)

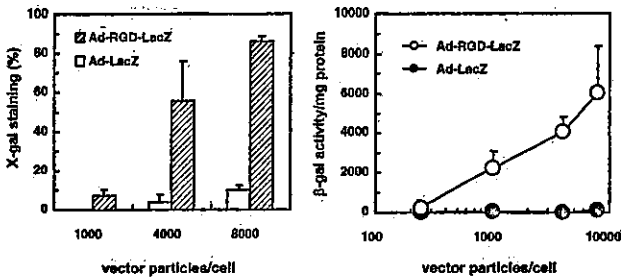


図25 従来型およびRGD配列を付与したアデノウイルスベクターによるヒト正常樹状細胞への遺伝子導入・発現効率

対して抗原遺伝子が効率よく導入され、抗原特異的なCTLの誘導能を顕著に亢進したという結果、すなわち、OVA発現Adを感染させたDC2.4 (マウス樹状細胞) をマウスに免疫した際の、OVA特異的細胞傷害性T細胞活性を測定したところ、Ad-RGD-OVAを感染させたDC2.4を免疫した群では、E.G7-OVA (OVAトランスフェクタント) に対して著しい細胞傷害活性が検出されるという結果も得られている^{34, 35, 36)} (図26)。さらに、Ad-RGDベクターの有用性は、サイトカイン (TNFα) やケモカイン (ILC, IL-11 receptor α-locus chemokine) を用いた癌遺伝子治療モデルでも立証されている^{37~40)}。

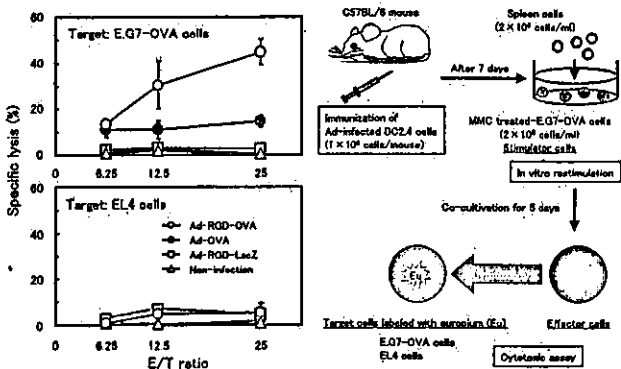


図26 従来型およびRGD配列を付与したアデノウイルスベクターによりOVA遺伝子導入したDC2.4細胞によるOVA特異的CTL誘導

4.3 トランスレーショナルリサーチの推進

バイオ創薬に必須なトランスレーショナルリサーチ (探索的臨床研究: TR) の推進にも、レギュラトリーサイエンスは重要な役割を担っている。

ポストゲノム時代において、有望なバイオ医薬品候補をより迅速・的確にピックアップし、効率的な開発の推進を図るためには、TRを適正に実施することが、きわめて重要な要素になるといわれている。

TRを適正に実施するために考慮すべき要素としては、科学的妥当性、倫理的妥当性、社会的理解や認知、及び規制環境の整備などがある。このうち、科学的妥当性については、結論的にいえば、それまでの基礎研究、開発研究などで得られた知見で当該医薬品の品質、安定性、安全性及び予想される有効性や性能の面から臨床試験を行うことの妥当性を明らかにすること、これにつきると考えられる⁴¹⁾。

表3には、臨床応用 (TR) 開始に際して考慮すべき科学的要素の例を示した。製造方法から体内動態等までについて最少限必要と思われるデータを適切に集め、結果を総括してTRに入ることの妥当性を示す必要がある。しかし、もちろん、これは、医薬品承認申請時におけるようなフルセットのデータが必ずしも求められている訳ではない。また、ここで重要なポイントは、臨床応用開始に必要なデータの種類やその程度は個別製品毎に異なるということである。その際、個別製品毎に、必要なデータをいかに合理的に集め、いかに適正なタイミングで臨床応用の開始に持っていかかが肝要である。

バイオ創薬の結果、開発されてくると予測される先端的バイオロジクスには、①細胞基材より生産されるタンパク質性医薬品 (ホルモン、酵素、サイトカイン類、分化・増殖・成長因子、血液凝固因子類、ワクチン類、抗体類等)、②遺伝子治療用医薬品、③細胞・組織利用医薬品・医療機器、④トランスジェニック動物由来タンパク質性医薬品、⑤トランスジェニック動物由来細胞・組織利用医薬品等、⑥トランスジェニック植物由来タンパク質性医薬品、⑦核酸医薬品 (アンチセンス、リボザイ

表3 TR開始に際して考慮すべき科学的要素の具体的事項例

- ・ 医薬品の種類
- ・ 製造方法の妥当性
- ・ 分子特性/細胞特性解析
- ・ 品質評価・管理
- ・ 安定性評価
- ・ 安全性 (感染性物質に対する安全性確保を含む)
- ・ 薬効の衰付け
- ・ 体内動態等
- ・ 臨床計画 (臨床目的・適用法)
- ・ 学術的知見・経験の多寡
- ・ 臨床応用後の情報収集体制

ム, siRNA, デコイ, DNAワクチン) などがある⁴²⁾。これらのTRに特に焦点をあてた公的指針等はないが、既存のガイドライン等が参考になることも多い。

例えば、細胞由来のタンパク質性医薬品の開発に関しては、すでにレギュラトリーサイエンスの一つの活動成果であるICH国際調和文書が作製されているので、これらに盛り込まれたプリンシプルを参考にするのが、最も適切なアプローチであると思われる。図27には、どのような事項や過程が、どのようなICHガイドラインを参考にできるかを示している^{42,43)}。

遺伝子治療用医薬品や細胞治療用医薬品などのTRについてはとりあえず表4に示したガイドラインが参考になる。遺伝子治療や細胞治療は、特に先端的な医療であるので、企業活動として研究用や治験用の遺伝子治療薬や細胞治療薬を製造し、これを臨床研究や治験に用いようとする場合、その品質・安全性につき、厚生労働大臣の確認を求められることができるということになっており、その際の基本的考え方や確認に必要な要件、資料等がこれらのガイドラインには示されている^{24,44,45)}。これらのガイドライン作成の過程で、レギュラトリーサイエンスを標榜する当所が中心的役割を担ってきたことは言うまでもない。しかし、品質・安全性試験や評価に関する基盤技術はこれから鋭意開発、整備していく必要があり、レギュラトリーサイエンスにおけるさらなる重点的

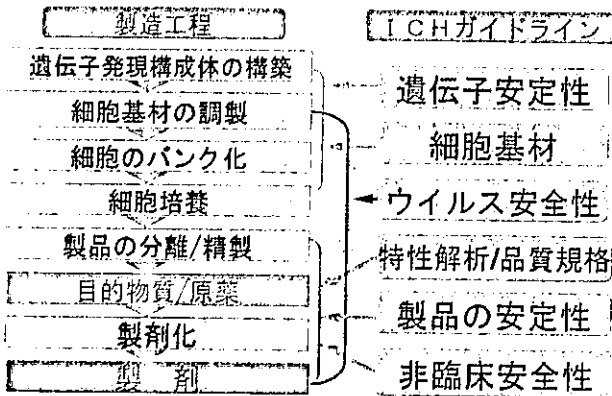


図27 細胞基材由来タンパク質性医薬品開発のためのICHガイドラインの活用

表4 バイオ創薬関連指針

- ・「遺伝子治療臨床研究に関する指針」
(文部科学省・厚生労働省告示第1号 平成14年3月27日文部科学大臣・厚生労働大臣)
- ・「遺伝子治療用医薬品の品質及び安全性の確保に関する指針」
(医薬発第0320004号 平成14年3月29日厚生労働省医薬局長)
- ・「細胞・組織利用医薬品等の取扱い及び使用に関する基本的考え方」
(厚生労働省医薬局長通知、医薬発第200号、平成13年3月28日)
- ・「ヒト由来細胞・細胞加工医薬品等の品質及び安全性の確保に関する指針」
(厚生労働省医薬局長通知、医薬発第1314号、平成12年12月26日)
- ・医薬品の臨床試験のための非臨床安全性試験の実施時期についてのガイドライン
- ・医薬品の臨床試験の実施の基準 (GCP)

取り組みが期待される。

はじめに述べたように、バイオ創薬は、生命科学分野での学問的解明や技術開発の進歩の延長線上にあるが、こうした基礎研究、基盤技術研究から臨床応用 (TR) にいかにスムーズに、合理的に至るかというポイントは、図28に示したような要素をみだしながら、相互の連携をいかに効率よく行うかにかかっている。レギュラトリーサイエンスには、さまざまな局面で役割があるが、特に規制環境の整備という場面では当所を中心としたレギュラトリーサイエンスが中核となる必要がある^{24,41,42)}。

5. バイオ創薬の適正かつ合理的な推進に必要な要素

バイオ創薬の適正かつ合理的な推進に必要な要素には、1) 生命科学の進歩、2) 創薬基盤技術開発、3) 基礎研究、基盤研究、開発研究の効率的連携、4) 科学的妥当性、倫理的妥当性、社会的理解・認知、経済的妥当性の確保と規制環境の整備、5) 産・学・官の連携、6) 国際共同活動と規制・基準の国際調和、7) 品質・有効性・安全性確保などが挙げられる。これらの要素のいずれにも、レギュラトリーサイエンスが果たすべき役割がある。

これからは医療技術的にも新しく、また、経済的妥当性、社会的理解・認知、倫理的妥当性の面でも予め用意された答えはない、いわば新たな挑戦となるものが次々と出てくることが予測される。これらについては、関係者がより優良な医薬品や適正な医療技術を患者さんに1日でも早く提供するという観点に立ち、英知を結集して、医療の進歩と課題の克服にあたるのが重要であると思われる。こうした中でレギュラトリーサイエンスのコンセプトは、創薬の推進を目指す企業、学界、公的研究機関、規制当局いずれもが共有し、それぞれの立場において最も有効に活用し、それぞれの機能が最大限発揮されるようにすべきであるとともに、そのために必要な密接な連携を深めるべきものである。

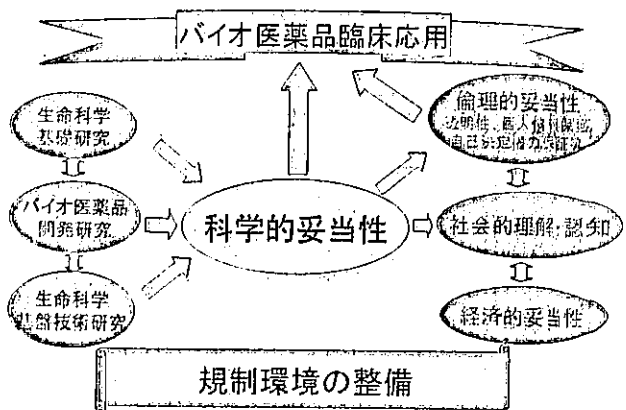


図28

謝 辞

本稿は、当所遺伝子細胞医薬部 水口裕之、櫻井文教、小泉直也、徐 志利、細野哲司、内田恵理子、押澤 正、山口照英各博士、及び生物薬品部 石井明子、太田美矢子、伊藤さつき、川崎ナナ、新見伸吾、川西 徹各博士による研究成果を基にしている。

参考文献

- 1) Hiroyuki MIZUGUCHI, Mark A. KAY and Takao HAYAKAWA: Approaches for generating recombinant adenovirus vectors, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **52**, 165-176 (2001)
- 2) Hiroyuki MIZUGUCHI, Naoya KOIZUMI, Tetsuji HOSONO, Naoki UTOGUCHI, Yoshiteru WATANABE, Mark A. KAY and Takao HAYAKAWA: 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)
- 3) Naoya KOIZUMI, Hiroyuki MIZUGUCHI, Tetsuji HOSONO, Akiko WATABE-ISHII, Eriko UCHIDA, Naoki UTOGUCHI, Yoshiteru WATANABE and Takao HAYAKAWA: Efficient Gene Transfer by Fiber-Mutant Adenoviral Vectors Containing RGD Peptide, *Biochim. Biophys. Acta.*, **1568**, 13-20 (2001)
- 4) Naoya KOIZUMI, Hiroyuki MIZUGUCHI, Akiko WATABE-ISHII, Eriko UCHIDA, Naoki UTOGUCHI, Yoshiteru WATANABE and Takao HAYAKAWA: Generation of Fiber-Modified Adenovirus Vectors Containing Heterologous Peptides in both HI Loop and C-terminus of the Fiber Knob, *J. Gene Med.*, **5**, 267-276 (2003)
- 5) Fuminori SAKURAI, Hiroyuki MIZUGUCHI and Takao HAYAKAWA: Efficient gene transfer into human CD 34+ Cells by an Adenovirus type 35 vector, *Gene Ther.*, **10**, 1041-1048 (2003)
- 6) Fuminori SAKURAI, Hiroyuki MIZUGUCHI, Teruhide YAMAGUCHI and Takao HAYAKAWA: Characterization of *in vitro* and *in vivo* gene transfer properties of adenovirus serotype 35 vector, *Mol. Ther.*, (in press)
- 7) Hiroyuki MIZUGUCHI, Mark A. KAY and Takao HAYAKAWA: *In vitro* ligation-based cloning of foreign DNAs into the E3 as well as E1 deletion region for generation of recombinant adenovirus vector, *Bio Techniques*, **30**, 1112-1116 (2001)
- 8) Hiroyuki MIZUGUCHI and Takao HAYAKAWA : The tet-off system is more effective than the tet-on system for regulating transgene expression in a single adenovirus vector, *J. Gene Med.*, **4**, 240-247 (2002)
- 9) Hiroyuki MIZUGUCHI and Takao HAYAKAWA: Characteristics of adenovirus-mediated tetracycline controllable expression system, *Biochim. Biophys. Acta.*, **1568**, 21-29 (2001)
- 10) Hiroyuki MIZUGUCHI, Zhi-Li XU, Fuminori SAKURAI, Tadanori MAYUMI and Takao HAYAKAWA: Tight positive regulation of transgene expression by a single adenovirus vector containing rtTA and tTS expression cassettes in separate genom regions, *Human Gene Ther.*, (in press)
- 11) Jin YUAN, Nana KAWASAKI, Noritaka HASHII, Satsuki ITOH, Toru KAWANISHI and Takao HAYAKAWA: Isotope-tag method for quantitative oligosaccharide profiling by capillary LC/ESI-MS, (in preparation)
- 12) Jin YUAN, Nana KAWASAKI, Noritaka HASHII, Satsuki ITOH, Toru KAWANISHI and Takao HAYAKAWA: Isotope-tag method for monosaccharide composition analysis of glycoproteins by capillary LC/ESI-MS, (in preparation)
- 13) Nana KAWASAKI, Satsuki ITOH, Miyako OHTA and Takao HAYAKAWA: Microanalysis of N-linked oligosaccharides in a glycoprotein by capillary liquid chromatography/mass spectrometry and liquid chromatography/tandem mass spectrometry, *Anal. Biochem.*, **316**, 15-22 (2003)
- 14) Nana KAWASAKI, Miyako OHTA, Satsuki ITOH, Masashi HYUGA, Sumiko HYUGA and Takao HAYAKAWA: Usefulness of sugar-mapping by liquid chromatography /mass spectrometry in comparability assessments of glycoprotein products, *Biologicals*, **30**, 113-124 (2002)
- 15) Miyako OHTA, Nana KAWASAKI, Satsuki ITOH and Takao HAYAKAWA: Usefulness of glycopeptide mapping by liquid chromatography/mass spectrometry in comparability assessment of glycoprotein products, *Biologicals*, **30**, 235-244 (2002)
- 16) Satsuki ITOH, Nana KAWASAKI, Miyako OHTA, Masashi HYUGA, Sumiko HYUGA and Takao HAYAKAWA: Simultaneous microanalysis of N-linked oligosaccharides in a glycoprotein using microbore graphitized carbon column liquid chromatography/mass spectrometry, *J. Chromatogr. A.*, **968**, 89-100 (2002)
- 17) Satsuki ITOH, Nana KAWASAKI, Miyako OHTA and Takao HAYAKAWA: Structural analysis of a glycoprotein by liquid chromatography/mass spectrometry and liquid chromatography with tandem mass spectrometry: Application to recombinant human thrombomodulin, *J. Chromatogr. A.*, **978**, 141-152 (2002)

- 18) Miyako OHTA, Nana KAWASAKI, Sumiko HYUGA, Masashi HYUGA and Takao HAYAKAWA: Selective glycopeptide mapping of erythropoietin by on-line high-performance liquid chromatography/electrospray ionization mass spectrometry, *J. Chromatogr. A.*, **910**, 1-11 (2001)
- 19) Nana KAWASAKI, Yuji HAISHIMA, Miyako OHTA, Satsuki ITOH, Masashi HYUGA, Sumiko HYUGA and Takao HAYAKAWA: Structural analysis of sulfated N-linked oligosaccharides in erythropoietin, *Glycobiology*, **11**, 1043-1049 (2001)
- 20) Nana KAWASAKI, Miyako OHTA, Sumiko HYUGA, Masashi HYUGA and Takao HAYAKAWA: Application of liquid chromatography/mass spectrometry and liquid chromatography with tandem mass spectrometry to the analysis of site-specific carbohydrate heterogeneity in erythropoietin, *Anal. Biochem.*, **285**, 82-91 (2000)
- 21) Takao HAYAKAWA, Miyako OHTA and Nana KAWASAKI: Current Analytical Procedures for Glycosylated Proteins, *Pharmaceutica Special Issue, Proceedings Biologicals Beyond 2000*, 87-102 (2000)
- 22) Nana KAWASAKI, Miyako OHTA, Sumiko HYUGA, Osamu HASHIMOTO and Takao HAYAKAWA: Analysis of carbohydrate heterogeneity in a glycoprotein using liquid chromatography/ mass spectrometry with tandem mass spectrometry, *Anal. Biochem.*, **269**, 297-303 (1999)
- 23) Shingo NIIMI, Tadashi OSHIZAWA, Teruhide YAMAGUCHI, Mizuho HARASHIMA, Taiichiro SEKI, Toyohiko ARIGA, Toru KAWANISHI and Takao HAYAKAWA: Specific Expression Of Annexin III In Rat Small Hepatocytes, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **300**, 770-774 (2003)
- 24) 早川 堯夫: バイオテクノロジーを応用した医薬品の特性解析, 品質及び安全性確保の評価科学—組換え医薬品, 細胞培養医薬品, 遺伝子治療用医薬品, 細胞治療用医薬品, トランスジェニック動物由来タンパク質性医薬品, トランスジェニック動物由来細胞治療医薬品—, *衛研報告*, **117**, 1-38 (1999)
- 25) 早川 堯夫, 内田 恵理子, 黒澤 努, 白倉 良太: トランスジェニック動物由来細胞の品質・安全性確保に関する基礎的研究, *医薬品研究*, **31**(11), 791-817 (2000)
- 26) 早川 堯夫: 感染性物質概論: バイオ医薬品の品質・安全性評価, 早川 堯夫, 山崎 修道, 延原 正弘 編, pp.101-122 (2001), エル・アイ・シー, 東京
- 27) 早川 堯夫, 山口 照英, 押澤 正: 日局生物薬品の品質・安全性確保に関する研究 —ウイルス安全性確保の基本要件—, *医薬品研究*, **33**, 210-230 (2002)
- 28) Kouei SATOH, Akiko IWATA, Mitsuhiro MURATA, Mikio HIKATA, Takao HAYAKAWA and Teruhide YAMAGUCHI: Virus Concentration Using Polyethyleneimine-conjugated Magnetic Beads for Improvement of Sensitivity in Nucleic Acid Amplification Tests, *J. Virol. Methods.*, (in press)
- 29) Akiko IWATA, Kouei SATOH, Mitsuhiro MURATA, Mikio HIKATA, Takao HAYAKAWA and Teruhide YAMAGUCHI: Virus Concentration Using Sulfated Magnetic Beads to improve Sensitivity in Nucleic Acid Amplification Tests, *Biol. Pharm. Bull.*, **26**, 1065-1069 (2003)
- 30) Akiko ISHII — WATABE, Eriko UCHIDA, Akiko IWATA, Ryuji NAGATA Kouei SATOH, Kejun FAN, Mitsuhiro MURATA, Hiroyuki MIZUGUCHI, Nana KAWASAKI, Toru KAWANISHI, Teruhide YAMAGUCHI and Takao HAYAKAWA: Detection of Replication-Competent Adenoviruses Spiked into Recombinant Adenovirus Vector Products by Infectivity-PCR (in preparation)
- 31) 早川 堯夫, 水口 裕之: 遺伝子治療用医薬品の実用化と一層の進展に向けて—次世代アデノウイルスベクターの開発—, *医薬ジャーナル*, **37**(5), 1514-1546 (2001)
- 32) Hiroyuki MIZUGUCHI and Takao HAYAKAWA: Enhanced Anti-tumor Effect and Reduced Vector Dissemination with Fiber-modified Adenovirus Vectors Expressing Herpes Simplex Virus Thymidine Kinase, *Cancer Gene Ther.*, **9**, 236-242 (2002)
- 33) Naoki OKADA, Yukiko TSUKADA, Shinsaku NAKAGAWA, Hiroyuki MIZUGUCHI, Kohei MORI, Tomomi SAITO, Takuya FUJITA, Akira YAMAMOTO, Takao HAYAKAWA and Tadanori MAYUMI: Efficient gene delivery into dendritic cells by fiber-mutant adenovirus vectors, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **282**, 173-179 (2001)
- 34) Naoki OKADA, Tomomi SAITO, Yasushige MASUNAGA, Yukiko TSUKADA, Shinsaku NAKAGAWA, Hiroyuki MIZUGUCHI, Kohei MORI, Yuka OKADA, Takuya FUJITA, Takao HAYAKAWA, Tadanori MAYUMI and Akira YAMAMOTO: Efficient antigen gene transduction using Arg-Gly-Asp fiber-mutant adenovirus vectors can potentiate anti-tumor vaccine efficacy and maturation of murine dendritic cells, *Cancer Res.*, **61**, 7913-7919 (2001)
- 35) Naoki OKADA, Yasushige MASUNAGA, Yuka OKADA, Sayaka IYAMA, Takashi TSUDA, Asako MATSUBARA, Naoki MORI, Hiroyuki MIZUGUCHI,

- Takao HAYAKAWA, Takuya FUJITA and Akira YAMAMOTO: Gene transduction efficiency and the state of maturation in mouse dendritic cells infected with conventional or RGD fiber-mutant adenovirus vectors, *Cancer Gene Ther.*, **10**, 421-431 (2003)
- 36) Naoki OKADA, Yasushige MASUNAGA, Sayaka IYAMA, Takashi TSUDA, Naoki MORI, Akinori SASAKI, Yuka OKADA, Hiroyuki MIZUGUCHI, Takao HAYAKAWA, Shinsaku NAKAGAWA, Tadanori MAYUMI, Takuya FUJITA and Akira YAMAMOTO : Murine Dendritic Cells Transduced with Human gp100 Gene by RGD Fiber-mutant Adenovirus Vectors Are Highly Efficacious in Generating Anti-melanoma *Cancer Gene Ther.*, (in press)
- 37) Yuka OKADA, Naoki OKADA, Shinsaku NAKAGAWA, Hiroyuki MIZUGUCHI, Makiko KANEHIRA, Naoko NISHINO, Koichi TAKAHASHI, Nobuyasu MIZUNO, Takao HAYAKAWA and Tadanori MAYUMI: Fiber-mutant technique can augment gene transduction efficacy and anti-tumor effects against established murine melanoma by cytokine-gene therapy using adenovirus vectors, *Cancer Letter*. 2002 Mar 8, **177**(1), 57-63(2002)
- 38) Yuka OKADA, Naoki OKADA, Shinsaku NAKAGAWA, Hiroyuki MIZUGUCHI, Koichi TAKAHASHI, Nobuyasu MIZUNO, Takuya FUJITA, Akira YAMAMOTO, Takao HAYAKAWA and Tadanori MAYUMI: Tumor necrosis factor α -gene therapy for an established murine melanoma using RGD (Arg-Gly-Asp) fiber-mutant adenovirus vectors, *Jap.J.Cancer Res.*, **93**, 436-444 (2002)
- 39) Yuka OKADA, Naoki OKADA, Hiroyuki MIZUGUCHI, Takao HAYAKAWA, Tadanori MAYUMI and Nobuyasu MIZUNO : An investigation of adverse effects caused by the injection of high-dose TNF α -expressing adenovirus vector into established murine melanoma, *Gene Ther.* **10**, 700-705 (2003)
- 40) Jian-Qing GAO, Yasuhiro TSUDA, Kazufumi KATAYAMA, Takashi NAKAYAMA, Yutaka HATANAKA, Yoichi TANI, Hiroyuki MIZUGUCHI, Takao HAYAKAWA, Osamu YOSHIE, Yasuo TSUTSUMI, Tadanori MAYUMI and Shinsaku NAKAGAWA: Anti-tumor effect by interleukin-11 receptor α -locus chemokine/CCL27, introduced into tumor cells through a recombinant adenovirus vector, *Cancer Res.*, **63**, 4420-4425 (2003)
- 41) 早川堯夫, 石井(渡部)明子: 生物薬品の開発の現状とトランスレーショナルリサーチへの条件, *医学のあゆみ*, **200**, 539-543 (2002)
- 42) 早川堯夫, 石井(渡部)明子: 先端的バイオロジクス開発の現状と新たなバイオ創薬に向けての課題, *医薬品研究*, **33**, 693-729 (2002)
- 43) Takao HAYAKAWA: Perspective on assessing comparability of biotechnology products- a view from Japan- Biologics 2000. Brown F, Lubiniecki A, Murano G (eds), *Dev. Biol. Stand., Basel, Karger*, **109**, 27-40 (2002)
- 44) 早川堯夫: 細胞・組織利用医薬品等の品質・安全性の確保, *バイオ医薬品の品質・安全性評価*, 早川堯夫, 山崎修道, 延原正弘編, pp.397-419 (2001), エル・アイ・シー, 東京
- 45) 早川堯夫: 遺伝子治療用医薬品の品質, 安全性等の確保, *バイオ医薬品の品質・安全性評価*, 早川堯夫, 山崎修道, 延原正弘編, pp.341-350 (2001), エル・アイ・シー, 東京

Prevention of Autoantibody-Mediated Graves'-Like Hyperthyroidism in Mice with IL-4, a Th2 Cytokine

Yuji Nagayama,^{1*} Hiroyuki Mizuguchi,[†] Takao Hayakawa,[†] Masami Niwa,^{*} Sandra M. McLachlan,[‡] and Basil Rapoport[‡]

Graves' hyperthyroidism has long been considered to be a Th2-type autoimmune disease because it is directly mediated by autoantibodies against the thyrotropin receptor (TSHR). However, several lines of evidence have recently challenged this concept. The present study evaluated the Th1/Th2 paradigm in Graves' disease using a recently established murine model involving injection of adenovirus expressing the TSHR (AdCMVTSHR). Coinjection with adenovirus expressing IL-4 (AdRGDCMVIL-4) decreased the ratio of Th1/Th2-type anti-TSHR Ab subclasses (IgG2a/IgG1) and suppressed the production of IFN- γ by splenocytes in response to TSHR Ag. Importantly, immune deviation toward Th2 was accompanied by significant inhibition of thyroid-stimulating Ab production and reduction in hyperthyroidism. However, in a therapeutic setting, injection of AdRGDCMVIL-4 alone or in combination with AdCMVTSHR into hyperthyroid mice had no beneficial effect. In contrast, coinjection of adenoviruses expressing IL-12 and the TSHR promoted the differentiation of Th1-type anti-TSHR immune responses as demonstrated by augmented Ag-specific IFN- γ secretion from splenocytes without changing disease incidence. Coinjection of adenoviral vectors expressing IL-4 or IL-12 had no effect on the titers of anti-TSHR Abs determined by ELISA or thyroid-stimulating hormone-binding inhibiting Ig assays, suggesting that Ab quality, not quantity, is responsible for disease induction. Our observations demonstrate the critical role of Th1 immune responses in a murine model of Graves' hyperthyroidism. These data may raise a cautionary note for therapeutic strategies aimed at reversing Th2-mediated autoimmune responses in Graves' disease in humans. *The Journal of Immunology*, 2003, 170: 3522–3527.

Graves' disease is an Ab-mediated organ-specific autoimmune disease in which stimulating anti-thyrotropin receptor (TSHR)² autoantibodies (thyroid-stimulating Abs, TSAbs) are responsible for hyperthyroidism and goiter by overstimulating the TSHR (reviewed in Refs. 1 and 2). Because of the role of autoantibodies, Graves' disease has long been considered to be a Th2-dominated disease. Support for this hypothesis includes features of atopy such as elevated serum IgE in some Graves' patients (3) as well as the induction of Graves' disease in patients with multiple sclerosis (a Th1-dominated autoimmune disease) following treatment with monoclonal anti-CD52 Ab (4). On the other hand, cytokine expression profiles in sera and thyroid tissues from Graves' patients indicate a mixed Th1/Th2 immune response (reviewed in Ref. 5). Moreover, Graves' disease generally ameliorates during pregnancy, a Th2-dominant state (6), and even more important, TSAbs are IgG1 (7), a Th1-type subclass in humans.

Th1/Th2-type responses analyzed using two murine models of Graves' disease (8, 9) provide conflicting observations (10–14).

The pioneering "Shimojo" model involves injecting fibroblasts co-expressing the human TSHR and MHC class II into syngeneic AKR/N mice (8). In this model, a Th1 adjuvant (CFA) delays and a Th2 adjuvant (alum) accelerates disease induction, suggesting the importance of Th2 immune responses (10). However, injection of the fibroblasts is associated with marked splenocyte production of the Th1 cytokine IFN- γ but not the Th2 cytokine IL-4 (11). In outbred NMRI mice vaccinated with TSHR-DNA, the presence of B cells, IL-4-producing T cells, and mast cells infiltrating the thyroid glands reflects Th2 responses (9). On the other hand, the same researchers have shown that anti-TSHR mAbs established from the spleens of TSHR DNA-vaccinated BALB/c mice are all IgG2a (12), a murine Th1 subclass. Consistent with the latter observation, splenocytes from TSHR-DNA-vaccinated BALB/c mice secrete IFN- γ , but not IL-4, in response to TSHR Ag (13) and T cell responses to TSHR-DNA vaccination are generated in IFN- γ KO BALB/c mice (14). The above discrepancies could be related to studies being performed in different laboratories, with different mouse strains and different cell types. Moreover, neither the Shimojo model nor naked DNA vaccination are suitable for definitive testing of the Th1/Th2 paradigm in Graves' disease for the following reasons: 1) nonspecific immune activation induced by costimulatory molecules expressed on the injected fibroblasts prevents detailed Ab analysis or in vitro studies in the Shimojo model (11) and 2) induction of TSAbs is very rare and hyperthyroidism fails to develop in inbred mice vaccinated with TSHR-DNA (13).

A novel murine model developed in our laboratory provides the opportunity for in vivo and in vitro analysis of the Th1/Th2 paradigm in Graves' disease. Intramuscular injection of adenovirus coding the TSHR induces TSAbs and hyperthyroidism in >50% of female BALB/c mice (15). In the present study, we determined the outcome of injecting adenoviruses expressing the TSHR in combination with adenovirus expressing IL-4 or IL-12. We found that

*Department of Pharmacology 1, Nagasaki University School of Medicine, Nagasaki, Japan; [†]Division of Biological Chemistry and Biologicals, National Institute of Health Sciences, Tokyo, Japan; and [‡]Autoimmune Disease Unit, Cedars-Sinai Research Institute and School of Medicine, University of California, Los Angeles, CA 90048

Received for publication October 21, 2002. Accepted for publication January 23, 2003.

The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. This article must therefore be hereby marked *advertisement* in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

¹ Address correspondence and reprint requests to Dr. Yuji Nagayama, Department of Pharmacology 1, Nagasaki University School of Medicine, 1-12-4 Sakamoto, Nagasaki 852-8523 Japan. E-mail address: nagayama@net.nagasaki-u.ac.jp

² Abbreviations used in this paper: TSHR, thyrotropin receptor; TSAbs, thyroid-stimulating Abs; TSH, thyroid-stimulating hormone; TBIAbs, TSH-binding inhibiting Abs; TBAb, TSH-blocking Ab; T₄, thyroxine; MOI, multiplicity of infection; AIHA, autoimmune hemolytic anemia.