

- [177] S. Roy, P.S. Shirley, A. McClelland, M. Kaleko, Circumvention of immunity to the adenovirus major coat protein hexon, *J. Virol.* 72 (1998) 6875–6879.
- [178] N. Morral, W. O'Neal, K. Rice, M. Leland, J. Kaplan, P.A. Piedra, H. Zhou, R.J. Parks, R. Velji, E. Aguilar-Cordova, S. Wadsworth, F.L. Graham, S. Kochanek, K.D. Carey, A.L. Beaudet, Administration of helper-dependent adenoviral vectors and sequential delivery of different vector serotype for long-term liver-directed gene transfer in baboons, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 96 (1999) 12816–12821.
- [179] W. Gao, P.D. Robbins, A. Gambotto, Human adenovirus type 35: nucleotide sequence and vector development, *Gene Ther.* 10 (2003) 1941–1949.
- [180] P. Seshidhar Reddy, S. Ganesh, M.P. Limbach, T. Brann, A. Pinkstaff, M. Kaloss, M. Kaleko, S. Connelly, Development of adenovirus serotype 35 as a gene transfer vector, *Virology* 311 (2003) 384–393.
- [181] R. Vogels, D. Zuijgeest, R. van Rijnsoever, E. Hartkoorn, I. Damen, M.P. de Bethune, S. Kostense, G. Penders, N. Helmus, W. Koudstaal, M. Cecchini, A. Wetterwald, M. Sprangers, A. Lemckert, O. Ophorst, B. Koel, M. van Meerendonk, P. Quax, L. Panitti, J. Grimbergen, A. Bout, J. Goudsmit, M. Havenga, Replication-deficient human adenovirus type 35 vectors for gene transfer and vaccination: efficient human cell infection and bypass of preexisting adenovirus immunity, *J. Virol.* 77 (2003) 8263–8271.
- [182] F. Sakurai, H. Mizuguchi, T. Hayakawa, Efficient gene transfer into human CD34⁺ cells by an adenovirus type 35 vector, *Gene Ther.* 10 (2003) 1041–1048.
- [183] T. Nguyen, J. Nery, S. Joseph, C. Rocha, G. Carney, K. Spindler, L. Villarreal, Mouse adenovirus (MAV-1) expression in primary human endothelial cells and generation of a full-length infectious plasmid, *Gene Ther.* 6 (1999) 1291–1297.
- [184] A. Francois, N. Etteradossi, B. Delmas, V. Payet, P. Langlois, Construction of avian adenovirus CELO recombinants in cosmids, *J. Virol.* 75 (2001) 5288–5301.
- [185] P.S. Reddy, N. Idamakanti, Y. Chen, T. Whale, L.A. Babiuk, M. Mehtali, S.K. Tikoo, Replication-defective bovine adenovirus type 3 as an expression vector, *J. Virol.* 73 (1999) 9137–9144.
- [186] E.J. Kremer, S. Boutin, M. Chillon, O. Danos, Canine adenovirus vectors: an alternative for adenovirus-mediated gene transfer, *J. Virol.* 74 (2000) 505–512.
- [187] S. Moffatt, J. Hays, H. HogenEsch, S.K. Mittal, Circumvention of vector-specific neutralizing antibody response by alternating use of human and non-human adenoviruses: implications in gene therapy, *Virology* 272 (2000) 159–167.
- [188] S.F. Farina, G.-P. Gao, Z.Q. Xiang, J.J. Rux, R.M. Burnett, M.R. Alvira, J. Marsh, H.C. Ertl, J.M. Wilson, Replication-defective vector based on a chimpanzee adenovirus, *J. Virol.* 75 (2001) 11603–11613.

Mini Review

改良型アデノウイルスベクターを用いた造血幹細胞，間葉系幹細胞，ES細胞への高効率遺伝子導入

水口裕之¹⁾，川端健二¹⁾，櫻井文教¹⁾，早川堯夫²⁾

¹⁾独立行政法人医薬基盤研究所 遺伝子導入制御プロジェクト

²⁾独立行政法人医薬品医療機器総合機構

Efficient gene transfer into hematopoietic stem cell, mesenchymal stem cell, and ES cell by modified adenovirus vectors

Efficient gene transfer into stem cells which are able to self-renew and differentiate into certain type of cell is essential for not only defining the precise molecular mechanism of self-renewal and differentiation, but the supplying of the cells for regenerative medicine. In this paper, we review our approach to the efficient gene transfer into hematopoietic stem cell, mesenchymal stem cell, and ES cell by modified adenovirus vectors.

Rec.11/30/2004, Acc.2/4/2005, pp447-451

Hiroyuki Mizuguchi¹⁾, Kenji Kawabata¹⁾, Fuminori Sakurai¹⁾ and Takao Hayakawa²⁾

¹⁾Laboratory of Gene Transfer and Regulation, National Institute of Biomedical Innovation

²⁾Pharmaceuticals and Medical Devices Agency

Key words

adenovirus vector, gene transfer, hematopoietic stem cell, mesenchymal stem cell, ES cell

はじめに

造血幹細胞，間葉系幹細胞，ES細胞（多能性幹細胞）をはじめとする幹細胞は，自己複製能を有する一方で，多くの種類の細胞を産生する多分化能を有することから，再生医療のための細胞ソースとして注目されている。また，近年の研究によりこれら幹細胞の自己複製能の維持や，特定の細胞への分化能の獲得に関与する遺伝子が次々と同定され，細胞分化を自在に制御することも可能になりつつある。細胞増殖・分化の分子機構の解明には外来遺伝子を導入して発現させたり，あるいは特定の遺伝子の発現を抑制させたりすることが必要であり，効率の良い遺伝子導入法は必要不可欠である。これまでは，造血幹細胞や間葉系幹細胞，ES細胞への遺伝子導入にはレトロウイルスベクターやレンチウイルスベクターが汎用

されてきたが，これらのベクターによる遺伝子発現は染色体への導入遺伝子の組み込みを伴うため長期的・永続的なものとなり，細胞分化が起こった後も導入遺伝子の発現は続くことになる。細胞分化に関わる遺伝子の中には，分化完了後は発現（あるいは抑制）を必要としない場合も多くあることが考えられ，このような場合には一過性の遺伝子発現（抑制）をもたらすベクター系が好ましいことになる。アデノウイルスベクターは，導入遺伝子が染色体外でエピゾーマルに存在し自律複製することはないため，一過性の遺伝子発現を示し，接着系細胞をはじめとする多くの細胞種に対して効率良く遺伝子導入できることが知られている。しかしながら，造血幹細胞，間葉系幹細胞，ES細胞への遺伝子導入効率は低く，これらの細胞への適用には不向きであった。筆者らが開発を進め

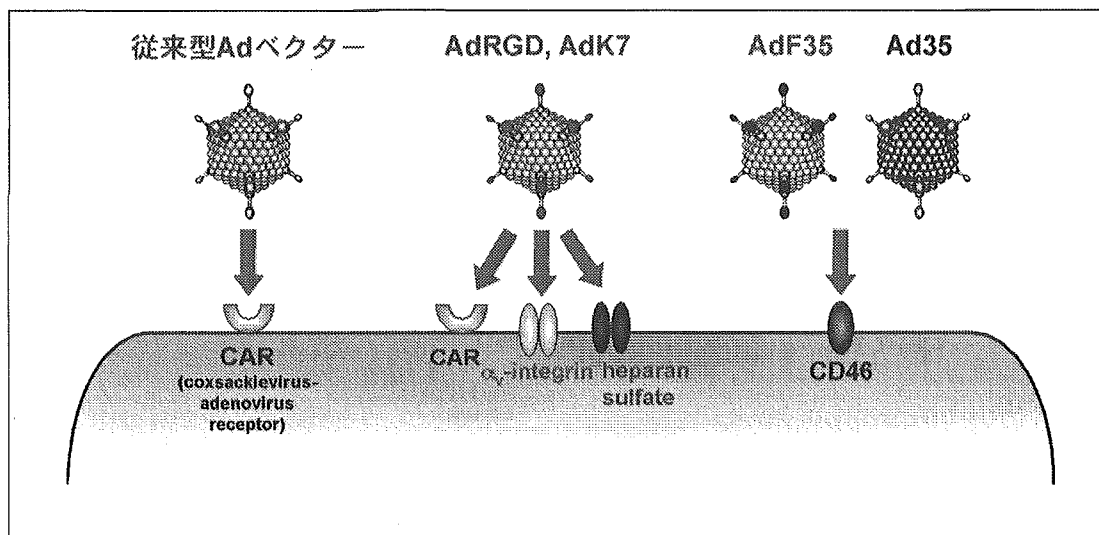


図1 改良型アデノウイルスベクターによる遺伝子導入

野生型のファイバーを持った従来型の5型アデノウイルスベクターは細胞表面上の受容体であるCARを認識して感染するが, RGD配列やポリリジン (K7: リジンが7つ続く) 配列をファイバーに有したファイバー改変ベクター(AdRGD, AdK7)はCARだけでなく αv インテグリンやヘパラン硫酸を認識しても感染できる。また, ファイバー部分をサブグループBの35型アデノウイルスのファイバーに置換したベクター(AdF35)や, 全ての構造タンパク質が35型アデノウイルスからなるベクター(Ad35)は, CD46を認識して感染する。

ている改良型アデノウイルスベクターは, これらの幹細胞へも効率良く遺伝子導入でき, 分化機構解明などの基礎研究や, 再生医療や遺伝子治療のための基盤技術になりうると期待される。

改良型アデノウイルスベクター

遺伝子治療や遺伝子導入用ベクターとして汎用されているアデノウイルスベクターは, サブグループCに属するヒト5型アデノウイルスを基盤としている(ヒトアデノウイルスはAからFまでのサブグループに分けられ, 計51種の血清型が存在する)。5型アデノウイルスの感染には, ウイルスカプシドタンパク質のファイバーと, 細胞表面上のCAR(coxsackievirus and adenovirus receptor)との結合を必要とするため, 従来のアデノウイルスベクターはCAR陽性細胞へは効率良く遺伝子導入できるが, CARの発現が乏しい細胞への遺伝子導入効率は低いことが課題であった。CARの発現が乏しい細胞としては, 造血幹細胞やT細胞をはじめとする血液系細胞, 間葉系幹細胞, 樹状細胞, 一部の癌細胞(特に悪性度の高い癌細胞), 血管内皮細胞, 滑膜細胞などが知られており, このような細胞へはアデノウイルスベクターの適用は不向きであった。

筆者らは, ファイバータンパク質の外來ペプチド挿入

部位として適したHIループやC末端コード領域に簡単に外來ペプチドコード遺伝子を挿入できるファイバー改変アデノウイルスベクター作製法を開発済みであり^{1,2)}, この技術と*in vitro*ライゲーションに基づいたE1欠損領域への外來遺伝子挿入法^{3,4)}(Clontech社よりキット化)を組み合わせることにより, 感染時のCAR依存性を克服した種々の改良型アデノウイルスベクターを簡単に作製することが可能となった。本法を用いて作製したファイバータンパク質のHIループやC末端領域にRGD(Arg-Gly-Asp)ペプチドやポリリジンペプチドを挿入したベクターでは, 多くの細胞で発現している αv インテグリンやヘパラン硫酸を認識して効率良く遺伝子導入することが可能となった^{1,2)}(図1)。また, ファイバータンパク質を, CD46を受容体とする35型アデノウイルス(サブグループBに属する)由来のものに置換したベクター⁵⁾や, 全ての構造タンパク質が35型アデノウイルスからなるベクターも開発済みである^{6,7)}(図1)。補体制御因子として知られているCD46は, ヒト由来の細胞ではほとんどの細胞で発現していることが知られており, 35型アデノウイルスベクター(あるいはファイバー部分が35型アデノウイルスからなる5型アデノウイルスをベースにしたベクター)は, ヒト由来細胞への有力なベクターである。

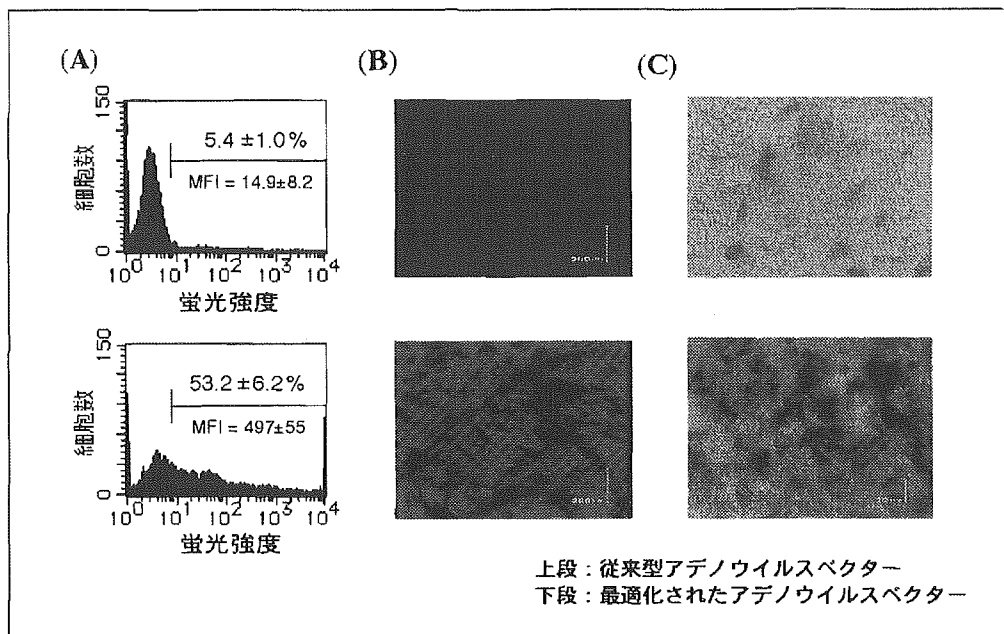


図2 改良型アデノウイルスベクターによる造血幹細胞(A), 間葉系幹細胞(B), ES細胞(C)への高効率遺伝子導入

(A)EGFP(enhanced green fluorescence protein)を発現する5型(従来型)アデノウイルスベクター(上段)あるいは35型アデノウイルスベクター(下段)(ともにCMVプロモーター)を、ヒト骨髓由来CD34陽性細胞へ作用させ(MOI=300; plaque forming unit/cell=300), EGFPの発現をフローサイトメーターで調べた。グラフ内の数字はEGFP陽性細胞の割合(%), および平均蛍光強度(mean fluorescence intensity: MFI)を示す。(B) β -ガラクトシダーゼを発現する5型(従来型)アデノウイルスベクター(上段; 3000 vector particle/cell)あるいはポリリジンペプチドを付与したファイバー改変アデノウイルスベクター(下段; 1000 vector particle/cell)(ともに β アクチンプロモーター/CMVエンハンサー)を、初代培養ヒト間葉系幹細胞へ作用させ、 β -ガラクトシダーゼの発現をX-gal染色で検討した。ポリリジンペプチドを付与したファイバー改変アデノウイルスベクターでは100%の細胞がX-gal陽性であったが、従来型アデノウイルスベクターでは改良型ベクターの3倍濃度を作用させてもX-gal陽性はわずかであった。(C)CMVプロモーター(上段)あるいはEF1 α プロモーター(下段)で β -ガラクトシダーゼを発現する従来型アデノウイルスベクターを、マウスES細胞(フィーダー細胞フリーの系)へ作用させ(1000 vector particle/cell), β -ガラクトシダーゼの発現をX-gal染色で検討した。EF1 α プロモーターを用いた場合、約90%以上の細胞がX-gal陽性であった。

改良型アデノウイルスベクターによる高効率遺伝子導入

1)造血幹細胞への遺伝子導入

ヒト造血幹細胞を含む画分であるCD34陽性細胞(本総説ではヒト造血幹細胞を含む画分であるCD34陽性細胞をあえて造血幹細胞として記述させていただく)では、CAR陽性細胞は数%と少なく、5型アデノウイルスベクターによる遺伝子導入効率も4~5%と極めて低い⁹⁾。一方、ほぼ全てのCD34陽性細胞はCD46を発現しており、35型アデノウイルスベクターを用いると50%以上の細胞に目的遺伝子を発現させることができる⁷⁾(図2A)。理由は不明

であるが(レセプターのCD46を発現しているにもかかわらず)、CD34陽性細胞への35型アデノウイルスベクター(種々のプロモーターを搭載したもので検討)の作用濃度を上げて60%以上の遺伝子発現効率を得ることは困難であった。そこで、GFP発現を指標に、35型アデノウイルスベクターで作用後のCD34陽性細胞をGFP陽性細胞と陰性細胞に分取して、それぞれの細胞分画中のアデノウイルスゲノム量を定量的PCR法で測定したところ、GFP陰性細胞にも陽性細胞と同程度のウイルスゲノムが存在していた⁸⁾。すなわち、約4割のCD34陽性細胞は、ウイルスは感染できるが遺伝子発現に至らないことが明らかとな

り、CD46の発現以外に遺伝子発現を決定する何らかの要因があることが示唆された。

2) 間葉系幹細胞への遺伝子導入

間葉系幹細胞における分化機構解明などの基礎研究には、細胞株が利用されることが多いが、最終的には初代培養細胞で機能を検証する必要があることは言うまでもない。しかしながら、ヒト間葉系幹細胞もCARの発現が乏しく、従来の5型アデノウイルスベクターでの遺伝子導入効率は極めて低い。筆者らのヒト初代培養間葉系幹細胞を用いた検討では、従来型アデノウイルスベクターに比べ、RGDペプチドを付与したアデノウイルスベクターでは約16倍、35型ファイバーを付与したベクターでは約130倍、ポリリジンペプチドを付与したベクターでは約460倍の遺伝子発現効率を示し、100%の細胞で目的遺伝子を発現させることが可能であった(図2B)⁹⁾。遺伝子発現期間に関しては継代培養を行わず培養を続けた場合は、1ヵ月以上にわたって遺伝子発現はほとんど低下せず、高レベルの発現を維持していた(継代培養を行い、細胞を常に分裂させて培養した場合は、細胞分裂に伴ってウイルスゲノムが希釈され、遺伝子発現は低下する)。

3) ES細胞への遺伝子導入

マウスES細胞への遺伝子導入には、プラスミドを用いたりポフェクションを用い、導入遺伝子が染色体に組み込まれたわずかの細胞を薬剤耐性遺伝子を用いて選択する方法が汎用されている。また、ポリオーマのlarge T抗原を発現させたES細胞の場合には、ポリオーマの複製起点をプラスミドに付与することでプラスミドが染色体外で複製し、遺伝子導入細胞を効率良く選択することが可能となる。これらはES細胞が細胞株であることを利用した外来遺伝子発現法であるが、前述のように、これらの遺伝子導入系では細胞分化の後も遺伝子発現が続くことによる問題を伴う。

アデノウイルスベクターはこれまでES細胞への遺伝子導入には用いられてこなかったが、マウスES細胞におけるCARの発現を検討したところ陽性であり、アデノウイルスはマウスES細胞に感染できることが判明した¹⁰⁾。ところが、多くの遺伝子発現実験で用いられ強力な発現を示すことが知られているCMV(サイトメガロウイルス)プロモーターでは、ほとんど全く遺伝子発現を誘導せず、アデノウイルスベクターがマウスES細胞には遺伝子導入できないと信じられていたことは、ウイルスの細胞へのエントリーに問題があるのではなく、CMVプロモーターが機能しないことに依っていることが明らかとなった。各種のプロモーターを用いてアデノウイルスベクターによるマウスES細胞での外来遺伝子発現を検討したところ、

EF1 α (elongation factor 1 α)プロモーターを用いれば最も効率良く遺伝子発現させることができ、単回のアデノウイルスベクターの作用で、約90%以上のマウスES細胞へ外来遺伝子を発現させることが可能であった(図2C)。また、ES細胞の未分化性維持に必須の転写因子であるSTAT3(Signal Transducers and Activators of Transcription 3)¹¹⁾の機能を、STAT3のドミナントネガティブ体(STAT3F)をアデノウイルスベクターを用いて発現させることによって阻害させたところ、細胞は分化すること、この作用はNanog(ES細胞の分化多能性を維持できる必須転写因子)^{12,13)}を発現させることでレスキュー(STAT3Fを発現させても未分化性を維持)できることを実証した¹⁰⁾。したがって、一過性に単回のベクター作用で細胞集団全体(遺伝子導入細胞を選択するのではなく)としての機能を検討したい場合には、アデノウイルスベクターは有力なツールになると期待される。なお、CMVプロモーターでRGDやポリリジンペプチドを付与したファイバー改変アデノウイルスベクターを用いれば、ES細胞へは遺伝子は導入されているが発現せず、フィーダー細胞(CAR陰性)では目的遺伝子を発現するため、フィーダー細胞への選択的な遺伝子発現を得ることができる。ES細胞は増殖が早く、細胞分裂に伴ってウイルスゲノムが希釈されるため、1000 vector particle/cellの条件下でアデノウイルスベクターを作用させた場合、LacZ陽性細胞は遺伝子導入12日後にはほぼ消失した¹⁰⁾(8日後ではLacZ陽性細胞は認められた)。

4) 幹細胞以外の細胞への遺伝子導入

従来の遺伝子導入法ではほとんど遺伝子導入できなかったが、改良型アデノウイルスベクターを用いることによって劇的な遺伝子導入効率の改善が認められる代表的な細胞として樹状細胞があげられる。RGDペプチドを付与したファイバー改変アデノウイルスベクターでは、ヒト末梢血単球由来樹状細胞やマウス骨髄由来樹状細胞に対し、90~95%以上の高効率での遺伝子導入が可能であり^{14,15)}、樹状細胞を用いた基礎研究や免疫細胞治療(樹状細胞ワクチン)に向けた応用研究にとって必要不可欠なツールとなりつつある。

また、従来の5型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様々な細胞株についても、多くの場合ファイバー改変ベクターを用いることで遺伝子導入効率の改善が期待できる。例えば脂肪細胞分化研究に汎用されているマウス3T3-L1細胞では、ポリリジンペプチドを付与したファイバー改変ベクターを用いれば、90%以上の細胞に遺伝子を導入、発現させることができる¹⁰⁾(従来型アデノウイルスベクターでは数%の遺伝子導入効率しか示さない)。

おわりに

各種幹細胞への一過性の遺伝子導入は、改良型アデノウイルスベクターを用いることによって劇的に効率が改善され、目的にもよるが、遺伝子導入細胞のソーティングや選択を行わなくても、単回のベクター作用で細胞分化の制御などに利用可能な段階になった。今後、筆者らの開発したこれらのベクターが、幹細胞研究や再生医療研究などの基礎・応用研究に大きく貢献できることを期待している。

文 献

- 1) Mizuguchi H, Koizumi N, Hosono T, Utoguchi N, Watanabe Y, Kay MA, Hayakawa T: A simplified system for constructing recombinant adenoviral vectors containing heterologous peptides in the HI loop of their fiber knob. *Gene Ther*, 8: 730-735, 2001.
- 2) Koizumi N, Mizuguchi H, Utoguchi N, Watanabe Y, Hayakawa T: Generation of fiber-modified adenovirus vector containing heterologous peptides in both the HI loop and C terminus of the fiber knob. *J Gene Med*, 5: 267-276, 2003.
- 3) Mizuguchi H, Kay MA: Efficient construction of a recombinant adenovirus vector by an improved in vitro ligation method. *Hum Gene Ther*, 9: 2577-2583, 1998.
- 4) Mizuguchi H, Kay MA: A simple method for constructing E1 and E1/E4 deleted recombinant adenovirus vector. *Hum Gene Ther*, 10: 2013-2017, 1999.
- 5) Mizuguchi H, Hayakawa T: Adenovirus vectors containing chimeric type 5 and type 35 fiber proteins exhibit altered and expanded tropism and increase the size limit of foreign genes. *Gene*, 285: 69-77, 2002.
- 6) Sakurai F, Mizuguchi H, Hayakawa T: Efficient gene transfer into human CD 34⁺ cells by an adenovirus type 35 vector. *Gene Ther*, 10: 1041-1048, 2003.
- 7) Sakurai F, Mizuguchi H, Yamaguchi T, Hayakawa T: Characterization of in vitro and in vivo gene transfer properties of adenovirus serotype 35 vector. *Mol Ther*, 8: 813-821, 2003.
- 8) Sakurai F, Mizuguchi H, Kawabata K, Yamaguchi T, Hayakawa T: Optimization of adenovirus serotype 35 vectors for efficient transduction in human hematopoietic progenitors: comparison of promoter activities. *Gene Ther*, (in press), 2005.
- 9) Mizuguchi H, Kawabata K, Sakurai F, Sasaki T, Hayakawa T: Fiber-modified adenovirus vectors mediate efficient gene transfer into human mesenchymal stem cells and adipocytes. *Biochem Biophys Res Commun*, 332: 1101-1106, 2005.
- 10) Kawabata K, Mizuguchi H, Sakurai F, Yamaguchi T, Hayakawa T: Efficient gene transfer into mouse embryonic stem cells with adenovirus vectors. *Mol Ther*, 12: 547-554, 2005.
- 11) Niwa H, Burdon T, Chambers I, Smith A: Self-renewal of pluripotent embryonic stem cells is mediated via activation of STAT3. *Genes Dev*, 12: 2048-2060, 1998.
- 12) Mitsui K, Tokuzawa Y, Itoh H, Segawa K, Murakami M, Takahashi K, Maruyama M, Maeda M, Yamanaka S: The homeoprotein Nanog is required for maintenance of pluripotency in mouse epiblast and ES cells. *Cell*, 113: 631-642, 2003.
- 13) Chambers I, Colby D, Robertson M, Nichols J, Lee S, Tweedie S, Smith A: Functional expression cloning of Nanog, a pluripotency sustaining factor in embryonic stem cells. *Cell*, 113: 643-655, 2003.
- 14) Okada N, Tsukada Y, Nakagawa S, Mizuguchi H, Mori K, Saito T, Fujita T, Yamamoto A, Hayakawa T, Mayumi T: Efficient gene delivery into dendritic cells by fiber-mutant adenovirus vectors. *Biochem Biophys Res Commun*, 282: 173-179, 2001.
- 15) Okada N, Saito T, Masunaga Y, Tsukada Y, Nakagawa S, Mizuguchi H, Mori K, Okada Y, Fujita T, Hayakawa T, Mayumi T, Yamamoto A: 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.
- 16) Hosono T, Mizuguchi H, Katayama K, Koizumi N, Kawabata K, Yamaguchi T, Nakagawa S, Watanabe Y, Mayumi T, Hayakawa T: RNA interference of PPAR γ using fiber-modified adenovirus vector efficiently suppresses preadipocyte-to-adipocyte differentiation in 3T3-L1 cells. *Gene*, 348: 157-165, 2005.

カプシドタンパク質を改変した改良型アデノウイルスベクターによる高効率遺伝子導入

Efficient Gene Transfer by Capsid-Modified Improved Adenovirus Vectors

水口裕之*¹ 早川堯夫*²

アデノウイルスベクターは既存の遺伝子治療用ベクターの中では最も遺伝子導入効率に優れているが、アデノウイルス受容体 (CAR) を発現している細胞にしか遺伝子導入できないこと、ベクターの感染域に組織特異性がないことが課題となっている。筆者らは、これらの問題点を克服し、CAR 非依存的に高効率に遺伝子導入できるベクターや、ターゲティング能を有した改良型アデノウイルスベクターの開発を進めている。

1. はじめに

アデノウイルスベクターは遺伝子導入効率に優れていることから、がんをはじめとする疾患に対する遺伝子治療臨床研究や、遺伝子機能解析などを目的とした基礎研究に汎用されている。しかしながら、従来のアデノウイルスベクター (2型あるいは5型アデノウイルスを基盤としている) による遺伝子導入には、標的細胞にアデノウイルス受容体 (CAR: coxsackievirus-adenovirus receptor) の発現を必要とするため、CAR の発現が乏しい細胞 (造血幹細胞をはじめとする血液系細胞、間葉系幹細胞、樹状細胞、血管内皮細胞、血管平滑筋細胞、骨格筋細胞、滑膜細胞、多くのマウス由来の細胞株など) へはアデノウイルスベクターが適用できないことが問題となっている。また、がん細胞は悪性度の進行と共に、CAR の発現レベルが低下することが報告されており^{1, 2)}、アデノウイルスベクターを用いてがんを対象とした遺伝

子治療臨床研究を進める上で考慮すべき問題となっている。

筆者らのグループでは、このような問題を克服できるベクターとして、CAR を利用しなくても効率良く遺伝子導入できる改良型アデノウイルスベクターの開発を進めている。本稿では、感染域を改変したアデノウイルスベクターの開発とその応用例を紹介すると共に、カプシドタンパク質を改変することで、組織特異性を有したターゲティングアデノウイルスベクターの開発状況について簡単に紹介する。なお、アデノウイルスベクターに関する基本的な解説は、筆者らの過去の総説^{3, 4)}などを参考にしていきたい。

2. カプシドタンパク質を改変した改良型アデノウイルスベクターの開発

アデノウイルスベクターによる遺伝子導入時の CAR 依存性を克服するために、ファイバータンパク質を改変した改良型ベクターの開発が進んで

*¹Hiroyuki Mizuguchi 独医薬基盤研究所

*²Takao Hayakawa 国立医薬品食品衛生研究所 副所長

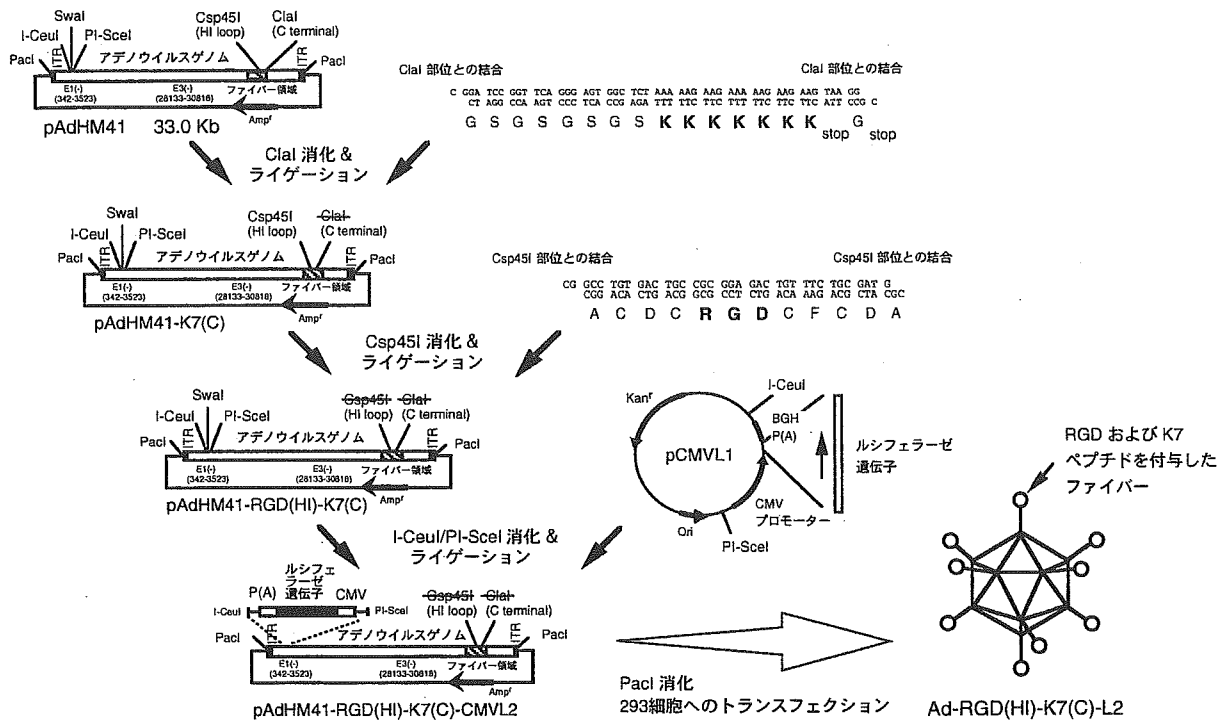


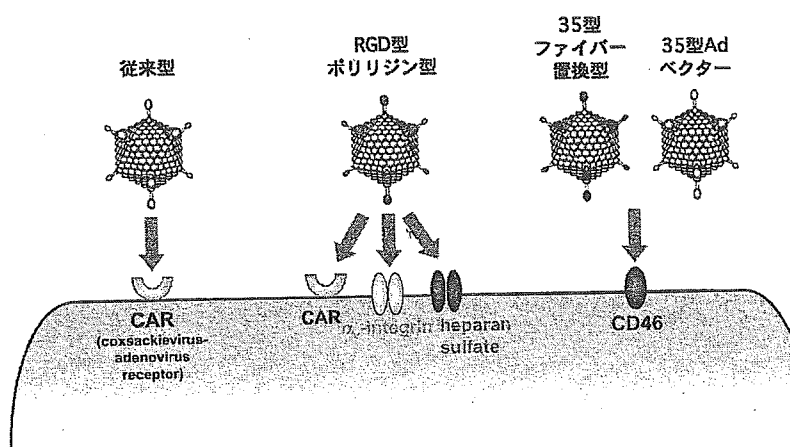
図1 ファイバー改変アデノウイルスベクターの作製法

ファイバーノブの HI ループあるいは C 末端をコードする遺伝子配列部分にユニークな制限酵素である Csp45I あるいは ClaI 部位（それぞれ）をもったベクタープラスミド pAdHM41 を両酵素で切断し、挿入したいペプチド（この場合 RGD 配列およびポリリジン配列）に相当する合成オリゴ DNA を *in vitro* ライゲーションで導入する。その後、I-CeuI と PI-SceI 部位を利用して *in vitro* ライゲーションでルシフェラーゼ遺伝子を E1 欠損部位に挿入する。生じたプラスミドをウイルスゲノム両末端に存在する PacI 部位で切断し、293 細胞にトランスフェクションすると、RGD 配列とポリリジン配列をファイバーに有するルシフェラーゼ発現アデノウイルスベクターができる。

いる。ファイバーはテール、シャフト、ノブの 3 領域からなり、ノブ領域が CAR と結合する。筆者らは、ファイバーノブの外來ペプチドの挿入部位として適した HI ループや C 末端コード領域に、1 ステップの *in vitro* ライゲーションで任意の外來ペプチドコード遺伝子を挿入できるシステムを開発しており、極めて簡便に様々なペプチドをファイバーに表現した改良型アデノウイルスベクターが作製できるようになった^{5, 6)} (図 1)。本ファイバー改変アデノウイルスベクター作製法を用いて、 αv インテグリンに親和性がある RGD (Arg-Gly-Asp) ペプチドや、ヘパラン硫酸に親和性があるポリリジンペプチドをファイバー表面上に遺伝子工学的に表現させることにより、CAR を発現していない細胞に対しても効率良く遺伝子導入できるベクターの作製も可能となった^{5, 6)} (図 2)。これらのベクターは、多くの細胞で発現

している αv インテグリンやヘパラン硫酸を認識して感染できることから、様々な細胞種や広範な目的への適用が期待できる。

ファイバー改変アデノウイルスベクターとしては、ファイバー領域だけを CAR 以外の分子を受容体としている 5 型アデノウイルスとは異なった血清型のアデノウイルス (3・11・35 型など sub-group B に属するアデノウイルス) 由来のファイバーに置換したベクターも開発されている。筆者らは、ファイバー部分を 35 型アデノウイルス由来のファイバーに置き換えたアデノウイルスベクター、および全ての構造タンパク質を 35 型アデノウイルス由来したベクターを開発しているが⁷⁻⁹⁾、これらのベクターは赤血球を除くほぼ全てのヒト由来細胞で発現が認められる CD46 を認識して感染できるため、ヒト由来細胞をターゲットとする場合には極めて有効である。しかし、齧



野生型のファイバーを持った従来型の5型アデノウイルスベクターは細胞表面上の受容体であるCARを認識して感染するが、RGD配列やポリリジン配列をファイバーに有したファイバー改変ベクターはCARだけでなく αv インテグリンやヘパラン硫酸を認識しても感染できる。また、35型のアデノウイルスのファイバーを有したベクターや、全ての構造タンパク質が35型アデノウイルスからなるベクターは、CD46を認識して感染する。

図2 ファイバー改変アデノウイルスベクター

歯類由来の細胞はCD46を発現しておらず、ほとんど遺伝子導入できないこと、本ベクターの *in vivo* の機能を評価する小動物（マウス、ラットなど）のモデルがなく（齧歯類由来の細胞へは遺伝子導入できないため）、遺伝子治療への応用を目的とした場合には課題点となっている。後者の問題を克服するために、筆者らはヒトCD46発現トランスジェニックマウスをモデル系として用いることで、35型アデノウイルスベクター（あるいは35型アデノウイルス由来のファイバーを有したベクター）の機能を検討中である。

感染域を変更する他のアプローチとして、ファイバーノブ部分をファイバータンパク質と同様に3量体を形成するレオウイルスの表面タンパク質である $\sigma 1$ に置き換え、 $\sigma 1$ が認識する junctional adhesion molecule 1 (JAM1) を認識して遺伝子導入できるようなアデノウイルスベクターも開発されている¹⁰⁾。

3. 改良型アデノウイルスベクターによる高効率遺伝子導入（応用例）

カプシドタンパク質を改変した改良型アデノウイルスベクターによる高効率遺伝子導入の応用例として、遺伝子治療や再生医療（細胞治療）で重要な細胞への適用について以下に簡単に紹介する。改良型アデノウイルスベクターを用いることで、従来は遺伝子導入が困難であった多くの細胞種に対して効率の良い遺伝子導入が可能となっており、基礎研究や治療を目的とした応用研究に極めて重

要な基盤技術になっている。

3.1 間葉系幹細胞

間葉系幹細胞は再生医療のための細胞ソースとして注目されており、細胞分化関連遺伝子を導入して目的細胞を分化誘導したり、治療用タンパク質を産生させるように細胞機能を改変した間葉系幹細胞を治療へ応用する場合には、高効率の遺伝子導入系が不可欠である。しかしながら、ヒト間葉系幹細胞はCARの発現が乏しく、従来の5型アデノウイルスベクターでの遺伝子導入効率は極めて低い。筆者らのヒト初代培養間葉系幹細胞を用いた検討では、従来型アデノウイルスベクターに比べ、RGDペプチドを付与したアデノウイルスベクターでは10数倍、35型ファイバーを付与したベクターでは200~300倍、ポリリジンペプチドを付与したベクターでは約1,000倍の遺伝子発現効率を示した。ヒト間葉系幹細胞への遺伝子導入にはポリリジン型の改変アデノウイルスベクターが最適であり、100%の細胞で目的遺伝子を発現させることが可能である（写真1）。

3.2 CD34陽性細胞

ヒト造血幹細胞を含む画分であるCD34陽性細胞では、CAR陽性細胞は数%と少なく、5型アデノウイルスベクターによる遺伝子導入効率も4~5%と極めて低い。一方、ほぼ全てのCD34陽性細胞はCD46を発現しており、35型アデノウイルスベクターを用いると50%以上の細胞に目

的遺伝子を発現させることができる⁸⁾。RGD型やポリリジン型の改変アデノウイルスベクターは、CD34陽性細胞への遺伝子導入には適していない。

3.3 樹状細胞

樹状細胞は生体防御を担う最も強力な抗原提示細胞であり、遺伝子改変を加えて樹状細胞機能を高めた細胞療法は、がんなどへの難治性疾患に対する新しい治療法として期待されている。しかしながら、従来の遺伝子導入法では樹状細胞への遺伝子導入も困難であることが知られている。アデノウイルスベクターを用いた場合も、ヒトおよびマウス樹状細胞（ヒト末梢血単球由来樹状細胞やマウス骨髄由来樹状細胞）への遺伝子導入効率は10%以下と低いが、RGD型の改変アデノウイルスベクターでは、ほぼ100%の遺伝子導入効率を示す^{11, 12)}。ヒト樹状細胞へは、35型ファイバー

を有したベクターも有効である。

3.4 その他

脂肪細胞分化研究に汎用されている細胞株である3T3-L1マウス脂肪前駆細胞や脂肪細胞への遺伝子導入には、ポリリジン型の改変アデノウイルスベクターが極めて有効である¹³⁾（写真2）。ヒト間葉系幹細胞から分化誘導した脂肪細胞に対しては35型ファイバーを有したベクターが有効である。

また、メラノーマに対しては一般にRGD型のベクターが適している^{6, 14)}。

4. ターゲティングアデノウイルスベクターの開発

標的細胞指向性を有したベクターの開発は、遺伝子治療の有効性と安全性の向上のために重要な

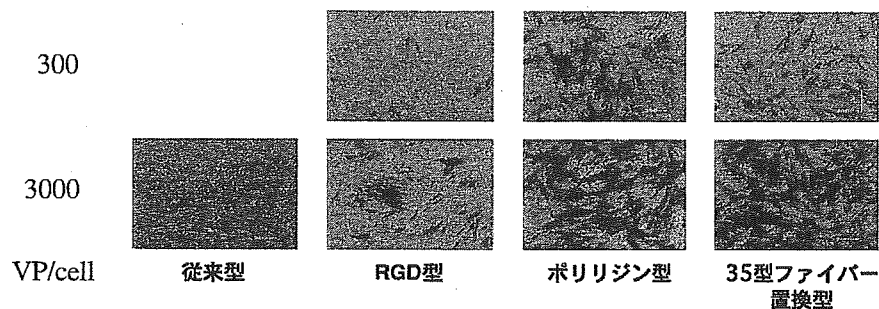


写真1 間葉系幹細胞に対する各種ファイバー改変アデノウイルスベクターの遺伝子発現効率

ヒト初代培養間葉系幹細胞に対して、 β ガラクトシターゼ (LacZ) を発現する各種ファイバー改変アデノウイルスベクター（従来型、RGD型、ポリリジン型、35型ファイバー置換型）を300または1,000 VP (vector particle)/cellの条件下で作用させ、2日後 X-gal 染色を行った。

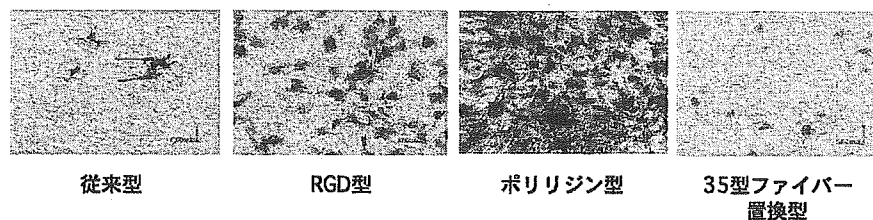


写真2 3T3-L1 脂肪前駆細胞に対する各種ファイバー改変アデノウイルスベクターの遺伝子発現効率

マウス3T3-L1細胞に対して、LacZを発現する各種ファイバー改変アデノウイルスベクター（従来型、RGD型、ポリリジン型、35型ファイバー置換型）を10,000 VP/cellの条件下で作用させ、2日後 X-gal 染色を行った。

研究課題である。遺伝子工学的にカプシドタンパク質を改変してターゲティング能を有したアデノウイルスベクターを作製するには、CAR を介した感染経路を遮断することが第一に必要である。また、低親和性であるがファイバーの根本に存在するペントンベースの RGD モチーフが αv インテグリンと結合することによって起こる感染ルートや、ファイバーのシャフト領域がヘパラン硫酸に結合することによって起こる感染ルートも遮断する必要がある。このような経路での感染を回避した改変アデノウイルスベクターのファイバー領域などに、ターゲット細胞特異的に結合するリガンドを付与すればターゲティングアデノウイルスベクターの開発が可能になる (図3)。

ファイバーノブの AB ループや FG ループに変異を導入すれば CAR と結合できないアデノウイルスベクターが作製でき¹⁵⁾、ペントンベースの RGD モチーフを欠損させれば、 αv インテグリンと結合できないベクターが作製できる¹⁶⁾。また、ファイバーのシャフト部分の KKTK からなるヘパリン結合ドメインを改変すればヘパラン硫酸と結合できないベクターができる¹⁷⁾。筆者らは、

KKTK 配列を欠く 35 型アデノウイルスのファイバーのシャフトに、CAR との結合能を欠損させた 5 型アデノウイルスのファイバーノブ、さらにペントンベースの RGD モチーフを欠損させたトリプル変異を有したアデノウイルスベクターが、従来のアデノウイルスベクターに比べマウス肝臓への移行活性 (アデノウイルスベクターは全身投与すると 95% 以上のベクターは肝臓に移行し遺伝子発現させる) が 3 万分の 1 以下に減少することを見出しており、積極的に特定の臓器に移行しないベクターの開発に成功している¹⁸⁾ (なお、1 つの領域だけに変異を加えたベクターでは肝移行性は減少させることができず¹⁶⁾、2 つの領域に変異を加えたベクターでは肝移行性は数百倍減少する¹⁸⁾)。本ベクターのファイバーノブの HI ループや C 末端コード領域には、任意の外来ペプチドコード遺伝子が容易に挿入できるように、制限酵素ユニーク部位が付与されており、リガンドを自在にベクター表面に表現できるようになっている。本システムが、ターゲティング能をもったアデノウイルスベクター開発のための基盤になると期待される。現在はいかにして親和性の高いター

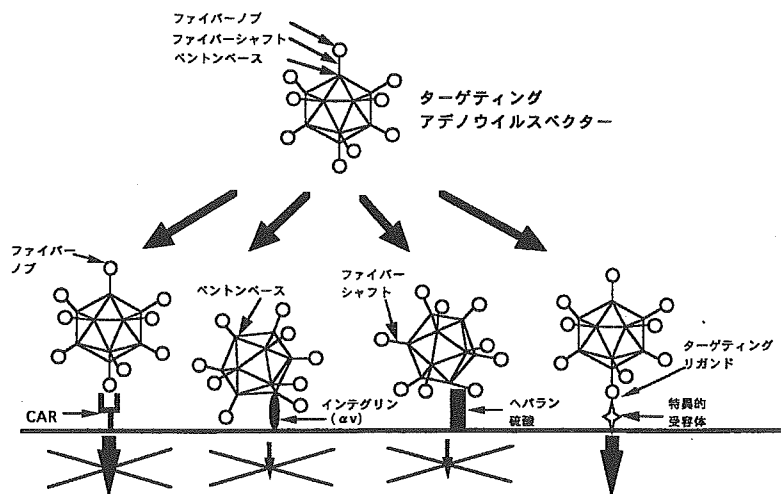


図3 ターゲティング能を有したアデノウイルスベクターの構造

ターゲティング能を有したアデノウイルスベクターの開発のためには、①ファイバーと CAR との結合を介した感染ルートを回避し、②低親和性であるがペントンベースの RGD モチーフが αv インテグリンと直接結合することによって起こる感染ルートを回避し、③ファイバーシャフト領域がヘパラン硫酸に作用することによって起こる感染ルートも回避し、④細胞特異的受容体を介してのみ感染するベクターを開発する必要がある。

ゲティングリガンドを同定するかが課題となっている。

5. おわりに

本稿では、遺伝子工学的にカプシドタンパク質を改変するアプローチによる改良型アデノウイルスベクターの開発について解説した。感染域を変更するためのアプローチとしては、抗体やタンパク質、高分子でベクター表面を修飾することによる生化学的・化学的方法もあり、さらに組織特異的プロモーターと組み合わせることで、より厳密な細胞特異的遺伝子発現の制御が可能となる。感染域を目的に応じて変更し、有効性・安全性を高めたベクターの開発は、遺伝子治療の進展につながるだけでなく、遺伝子の機能を解析するための必須の基盤技術にもなり、今後の研究の更なる発展が期待される。

文 献

- 1) Okegawa T., Pong R. C., Li Y., Bergelson J. M., Sagalowsky A. I., Hsieh J. T., *Cancer Res.*, **61**, 6592-6600 (2001)
- 2) Rauen K. A., Sudilovsky D., Le J. L., Chew K. L., Hann B., Weinberg V., Schmitt L. D., McCormick F., *Cancer Res.*, **62**, 3812-3818 (2002)
- 3) 水口裕之, 早川堯夫, *BIO INDUSTRY*, **18** (7), 5-14 (2001)
- 4) 水口裕之, 早川堯夫, *Mebio*, **21** (4), 8-16 (2004)
- 5) Mizuguchi H., Koizumi N., Hosono T., Utoguchi N., Watanabe Y., Kay M. A., Hayakawa T., *Gene Ther.*, **8**, 730-735 (2001)
- 6) Koizumi N., Mizuguchi H., Utoguchi N., Watanabe Y., Hayakawa T., *J. Gene Med.*, **5**, 267-276 (2003)
- 7) Mizuguchi H., Hayakawa T., *Gene*, **285**, 69-77 (2002)
- 8) Sakurai F., Mizuguchi H., Hayakawa T., *Gene Ther.*, **10**, 1041-1048 (2003)
- 9) Sakurai F., Mizuguchi H., Yamaguchi T., Hayakawa T., *Mol. Ther.*, **8**, 813-821 (2003)
- 10) Mercier G. T., Campbell J. A., Chappell J. D., Stehle T., Dermody T. S., Barry M. A., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **101**, 6188-6193 (2004)
- 11) 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)
- 12) Okada N., Saito T., Masunaga Y., Tsukada Y., Nakagawa S., Mizuguchi H., Mori K., Okada Y., Fujita T., Hayakawa T., Mayumi T., Yamamoto A., *Cancer Res.*, **61**, 7913-7919 (2001)
- 13) Hosono T., Mizuguchi H., Katayama K., Koizumi N., Kawabata K., Yamaguchi T., Nakagawa S., Watanabe Y., Mayumi T., Hayakawa T., *Gene*, in press.
- 14) Mizuguchi H., Hayakawa T., *Cancer Gene Ther.*, **9**, 236-242 (2002)
- 15) Roelvink P. W., Mi Lee G., Einfeld D. A., Kovacs I., Wickham, T., *Science*, **286**, 1568-1571 (1999)
- 16) Mizuguchi H., Koizumi N., Hosono T., Ishii-Watabe A., Uchida E., Utoguchi N., Watanabe Y., Hayakawa T., *Gene Ther.*, **9**, 769-776 (2002)
- 17) Smith T. A. G., Idamakanti N., Rollence M. L., Marshall-Neff J., Kim J., Mulgrew K., Nemerow G. R., Kaleko M., Stevenson S. C., *Hum. Gene Ther.* **14**, 777-787 (2003)
- 18) Koizumi N., Mizuguchi H., Sakurai F., Yamaguchi T., Watanabe Y., Hayakawa T., *J. Virol.*, **77**, 13062-13072 (2003)

☆

☆

☆

Cell delivery system に基づく次世代がん免疫療法

特集 耐性克服とDDS

杉田敏樹・高 建青・中川晋作

Development of cell delivery system for optimal cancer immunotherapy

The immune cells such as cytotoxic T lymphocytes, NK cells, and antigen presenting cells play a central role in cancer immunotherapy. These effector cells can be used as "drugs" for cancer therapy from the view of drug delivery system (DDS). We anticipated that optimal cancer immunotherapy can be achieved by controlling of the distribution of these so-called "live drugs" in the body. In the present study, we focus on a cell delivery system which can potentially control the systematic pharmacokinetics of immune cells and especially focus on the cell-migrating molecule, chemokine and its receptor, as well as its use in cancer immunotherapy.

がん免疫療法においては、がん細胞を直接傷害する免疫系細胞群やがん抗原の情報をとれら細胞群を提示し、活性化させる抗原提示細胞が生体内に送り、実際の治療を行う「薬物」として作用する。従って、drug delivery system (DDS) の観点からは、これら「生き薬」としての免疫系細胞群の体内動態を制御することや、がん免疫療法の最適化を達成するために重要なことになる。本稿では、生き薬細胞を薬物として提示した cell delivery system とともに、最新の DDS の概念について、筆者らの研究結果を中心に報告する。

Toshiki Sugita, Takao Takai, Shinshuke Nakagawa

Key words: drug delivery system, cell delivery system, chemokine, chemokine receptor, cancer immunotherapy

Cell delivery system に基づいたがん免疫療法

現在、がん治療では外科的療法、放射線療法、化学療法の三大療法が施行されている。しかし、いずれの治療法においても、ある程度の治療効果を示すものの、転移・再発に対してはまだまだ充分でないこと、また、化学療法・放射線療法においては、正常組織に対しても作用を及ぼすことによる嘔吐・脱毛・免疫抑制などの強い副作用が起こることなどの問題点を有している。

こうしたなか、現在第四の夢の治療法として期待が持たれているのが、がん免疫療法である。生体は元来備わっている免疫系により、外来から侵入してきた外的異物や生体内でのがん細胞・老朽化細胞などの内的異物を認識・排除して生命体の恒常性を維持している。がん免疫療法は、このシステムに着目

し自身の免疫機構を利用してがん細胞を排除しようとする治療法である。

抗腫瘍免疫応答の第一段階は、腫瘍局所ではがん抗原を取り込んだ樹状細胞 (DC) のリンパ組織への遊走である。その後、リンパ組織で DC から抗原感作を受け、活性化した免疫系細胞群が腫瘍局所へ浸潤し、それら細胞による直接的ながん細胞の排除が起こる。これまでのがん免疫療法は、サイトカイン療法や DC ワクチン療法、ペプチドワクチン療法など、この一連の免疫応答においていかにして免疫系を非特異的または特異的に誘導・活性化するかにか点が置かれている。

しかし、たとえば DC ワクチン療法やペプチドワクチン療法では、DC に抗原情報を取り込ませ、その情報を抗腫瘍エフェクター細胞に提示して活性化させる機能を獲得したとしても、その DC がリンパ組織に移行できなければ、抗腫瘍免疫反応を誘導することは出来ない。また、サイトカイン療法などで、がん細胞を特異的に攻撃する CD8 陽性細胞傷害性

* Department of Biopharmaceutics, Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Osaka University 大阪大学大学院薬学研究科薬剤学分野

T細胞(CTL: cytotoxic T lymphocyte), 非特異的に攻撃するNK(natural killer)細胞, マクロファージなどの抗腫瘍エフェクター細胞群を活性化させることが出来たとしても, それらの細胞が腫瘍組織に移行できなければ, その役割を果たすことは出来ない。事実, 一部の腫瘍においては免疫系が活性化しているにもかかわらず, 抗腫瘍エフェクター細胞が腫瘍内に浸潤しないために腫瘍が退縮しない例も報告されている¹⁾。

これらを踏まえると, がん免疫療法では, 治療効果を発揮する細胞群を目的とする標的組織(DCの場合はリンパ組織, T細胞の場合はがん組織)に効果的に送達させることが重要である。がん免疫療法では, 自己の免疫系細胞自身が, 他の免疫系細胞を活性化する, またその細胞が, がん細胞に対して傷害性を示すことから, これら治療効果を発揮する免疫細胞群は抗がん活性を有する薬物として捉えることが出来る。したがって, 薬物治療の最適化を目指すdrug delivery system(DDS)の概念からすると, がん免疫療法においては, 免疫担当細胞群を薬物として捉えたcell delivery systemともよぶべき新たな概念を導入することで, 治療の最適化が達成できるはずである。本稿では, このcell delivery systemに関する筆者らの取組みについて紹介する。

ケモカインを介した細胞浸潤機構

近年, 分子生物学の目覚ましい発展に伴い, ケモタクティックサイトカイン(ケモカイン)と総称される細胞遊走を司る分子群がづつづつと同定されている。現時点で50種類以上のケモカインが同定され, 一部のケモカインはリンパ球やDCといった免疫系細胞に特異的に作用することが報告されている²⁾。

これに伴いリンパ球の体内動態機構, たとえば, 炎症時における血中から組織への浸潤メカニズムなどが徐々に明らかになりつつある。成熟したリンパ球は脈管系(血管とリンパ管)と二次リンパ組織やその他の組織の間を絶えず再循環している。すなわち, 血管中のリンパ球は系統や機能的サブセットによってそれぞれ異なる組織の特定の微小環境にホーミングし, さらにホーミングした組織からリンパ管を経

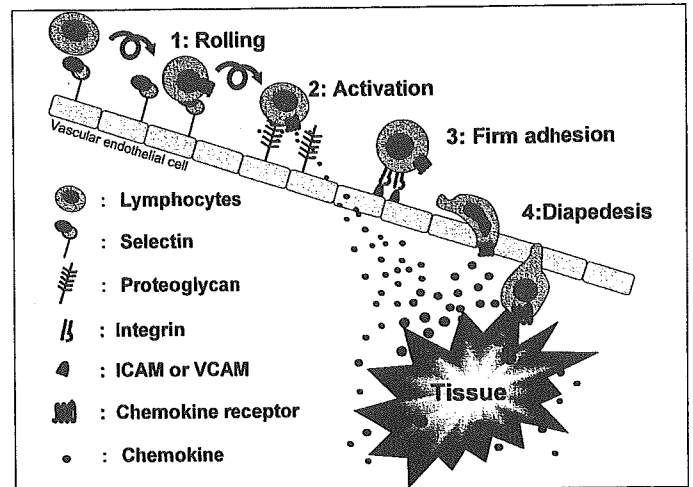


図1 Scheme of lymphocytes infiltration into tissue

て再び血液に戻る。このようなリンパ球の再循環は, 筆者らの免疫機構にとって必須のプロセスである。

リンパ球の組織浸潤については, 図1に示すとおり, まず血液中を流れているリンパ球が, 主にセレクチンのレクチン様ドメインとシアロムチンの糖鎖との接触によりブレーキがかかり, on-offの早い接触によって一時的に血管内腔にとどまる(1: Rolling)。この接触によってリンパ球は, 内皮細胞上のプロテオグリカンを介して提示されたケモカインの刺激を受け, インテグリンLFA-1(lymphocyte function-associated antigen)やVLA-4(very late antigen-4)が活性化される(2: Activation)。

つぎに, リンパ球はケモカインの刺激に伴い活性化されたインテグリンを介して, おおの血管内皮細胞上のICAM-1(intracellular adhesion molecule-1)やVCAM-1(vascular cell adhesion molecule-1)などの接着分子に強固に接着し(3: Firm adhesion), 最後に内皮細胞間隙を移行してケモカインの濃度勾配依存的に血管外に遊出(4: Diapedesis)する。

ケモカインはこのリンパ球浸潤経路のうち, 2~4の過程に必須の分子であり, いわばリンパ球の浸潤の要ともいえるべき存在である³⁻⁵⁾。さらに, ケモカインは対応するケモカインレセプターを発現しているリンパ球に特異的に作用することから, 特定のリンパ球の生体内動態を制御していると考えられる。

筆者らは, このケモカインが有する細胞遊走活性

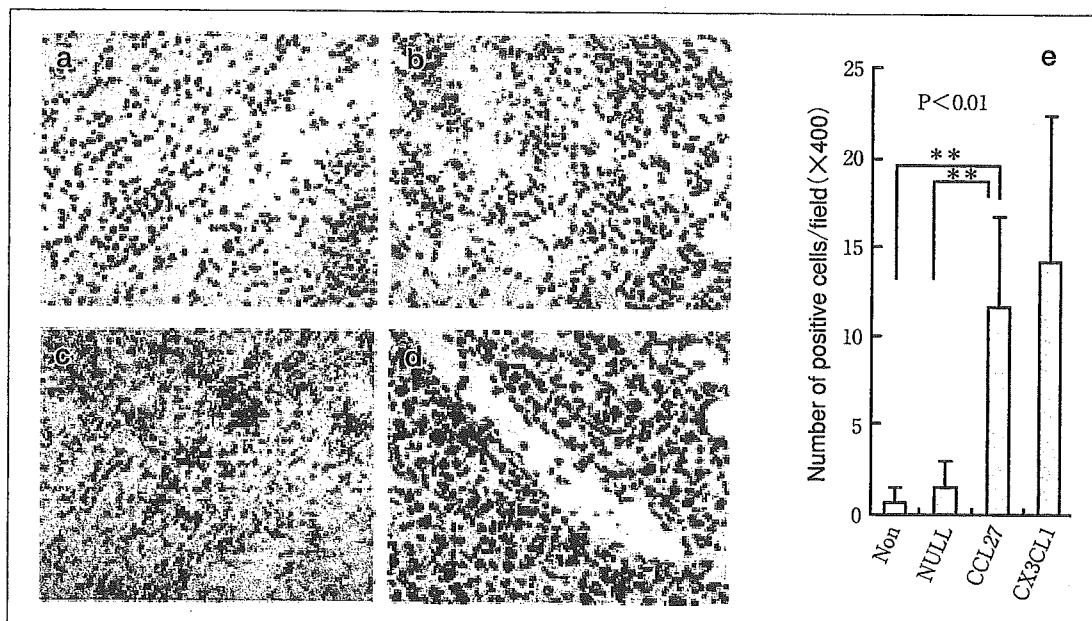


図 2

CD3-positive lymphocytes infiltrate into OV-HM tumors infected with Ad-RGD-CCL27 and Ad-RGD-CX3CL1. a~d, representative immunohistochemical appearances of tumor nodules from mice inoculated intradermally with 1×10^6 OV-HM cells infected with none (a), Ad-RGD-NULL (b), Ad-RGD-CCL27 (c), or Ad-RGD-CX3CL1 (d). Statistical analysis was carried out by Welch's *t* test.

を利用することで、細胞の体内動態制御を可能とする cell delivery system が達成できるのではないかと考えた。

ケモカインによる腫瘍組織内への細胞浸潤と腫瘍増殖抑制効果

筆者らは、数あるケモカインのなかでも、がんのエフェクター細胞である T 細胞や NK 細胞、免疫細胞の司令塔である DC などを遊走させることが *in vitro* で示唆されているケモカイン (CCL19⁶⁾, CCL20⁷⁾, CCL22⁸⁾, CCL27⁹⁾, XCL1¹⁰⁾, CX3CL1¹¹⁾) を選択し、それらを腫瘍組織に発現させることによる腫瘍組織内への細胞浸潤と腫瘍増殖抑制について検討を行った¹²⁻¹⁵⁾。腫瘍細胞にケモカインを発現させるにあたっては、ファイバー領域にインテグリン指向性の RGD 配列 (Arg-Gly-Asp) を挿入したファイバーミュータントアデノウイルスベクター (Ad-RGD) を用いた¹⁶⁾。この Ad-RGD は従来型アデノウイルスベクターとくらべ、高い遺伝子導入効率・発現効率を有している。

まず、Ad-RGD を用いて各種ケモカイン遺伝子を導入した OV-HM 細胞を同系マウスに移植し、ケモカインによって誘導される抗腫瘍効果を検討した。その結果、CCL27、CCL19 および CCL22 を発現する OV-HM 細胞移植群において顕著な腫瘍増殖抑制が確認された。これらケモカイン発現 OV-HM 腫瘍で得られた腫瘍増殖抑制は、腫瘍組織内に遊走したがんのエフェクター細胞によるものであることが予想される。

そこで CCL27 発現 OV-HM 細胞移植群について、がんの第一のエフェクター細胞である T 細胞の腫瘍内への浸潤を免疫染色法により確認した (図 2)。その結果、無処理およびコントロール Ad-RGD 処理 OV-HM 細胞移植群では、腫瘍組織内に CD3 陽性 T 細胞の浸潤がほとんど認められなかったのに対し、CCL27 発現 OV-HM 細胞移植群においては有意な CD3 陽性 T 細胞の浸潤が観察された。

本結果は、*in vitro* において CCL27 が CD3 陽性細胞に対して遊走活性を示すという事実から、*in vivo* においても同様に CD3 陽性 T 細胞に作用し、腫瘍内に浸潤、集積させたものと考えられる。しか

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返され、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。

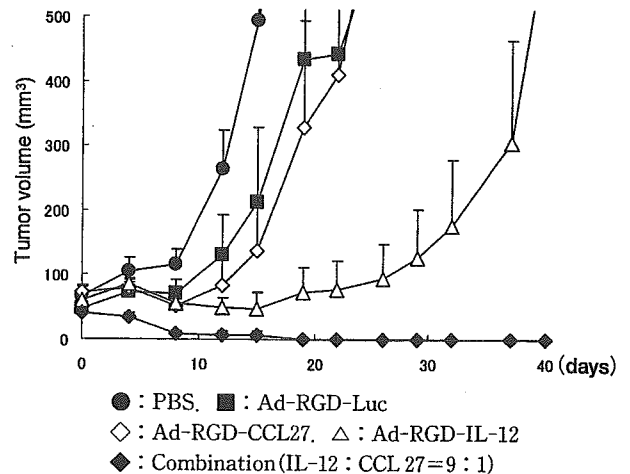


図 3 Synergistic anti-tumor effect of Ad-RGD-IL-12 and Ad-RGD-CCL27

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して試みられている。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

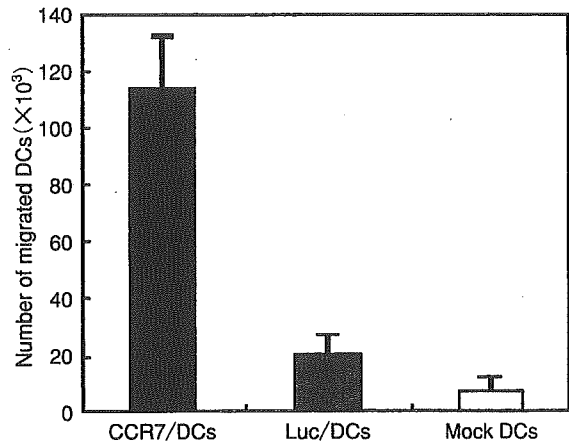


図 4 Migration of CCR7/DCs from administration site to draining lymph node

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 2×10^6 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 に十分に 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/CCL 27, 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).

細胞性製剤と細胞送達システム (Cell Delivery System)

Cytomedicine and Cell Delivery System

大阪大学大学院薬学研究科¹⁾, 神戸学院大学²⁾

中川晋作¹⁾, 真弓忠範²⁾

SHINSAKU NAKAGAWA¹⁾, TADANORI MAYUMI²⁾

Graduate School of Pharmaceutical Sciences School of Pharmaceutical Sciences Osaka University¹⁾

The Faculty of Pharmaceutical Sciences, KobeGakuin University²⁾

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形成されており、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、未分化細胞から必要な時に、必要な場所で、必要な量だけ産生される。また、それら分化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、この変化に適応するための生理活性物質の生合成機能、生合成された生理活性物質の分泌・徐放機能およびこれら諸機能を調節する制御機能等を有し、必要な時に、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。この中で驚嘆すべきことは、さまざまな制御の中で、いかにタイミングよく高度に分化した細胞が産生されているか、またいかに見事なタイミングで生理活性物質が細胞内で生合成され、細胞外に分泌・徐放されているかである。

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DDSを実践している粒子であり、機能面からいえば細胞に勝る製剤素材はない。現在、地球上に存在する最もインテリジェントな粒子は細胞である。人類は依然として人工的に細胞を創ることはできない。細胞を人工的に自由に創り得ないのであれば、せめてそれが成功するまでの永い期間は、「天から与えられた細胞」が隠し持つ潜在能力を最大限利用し、生きた細胞そのものを製剤化した「細胞性製剤」とも呼ぶべき剤形による疾病治療(細胞療法)の実現に向けて邁進するのが薬学を志す者の面目であろう。

細胞を用いる治療として、その細胞が、①種々の生理

活性物質を必要な時に生合成し、必要な量を細胞外へ分泌・徐放することによる治療、②細胞間接着による細胞間認識により、他の細胞の機能を向上させることによる治療、あるいは病態細胞に直接作用することによる治療などが考えられる。これら細胞性製剤を用いたいずれの治療においても、安全かつ有効な細胞療法を展開するためには、生きた細胞を薬物として捉えた“細胞送達システム(Cell Delivery System)”ともいうべきDDS概念が重要になってくる。

本稿では、細胞療法の最適化を目指したCell Delivery Systemに関するわれわれの取り組みについて概説する。

1. 機能性細胞の体内動態制御

細胞性製剤として疾病治療に用いる機能性細胞としては、(A)自己の細胞を含め組織適合性抗原が患者に適合している細胞を用いる場合と、(B)適合していない非自己の細胞を用いる場合に分類できる。前者の例としては、すでに骨髄移植という形で治療が行われている。また、その他にも胎児から分離されたドーパミン産生細胞やインスリン分泌能を有する膵臓のランゲルハンス島等が、冒頭で述べた①の治療として臨床応用されている。また、②の治療としては、免疫細胞を用いた癌治療があり、LAK(lymphokine-activated killer)療法¹⁾や腫瘍組織内浸潤リンパ球(tumor-infiltrating lymphocytes : TIL)療法²⁾、樹状細胞(Dendritic Cell : DC)療法^{3, 4)}等が検討されている。

このような中でわれわれは、薬物として働く機能性細胞の生体内安定性や体内動態を制御するCell Delivery Systemの概念に基づく癌免疫療法の最適化を試みている。DCは、T細胞を効率よく活性化し得る細胞であり、