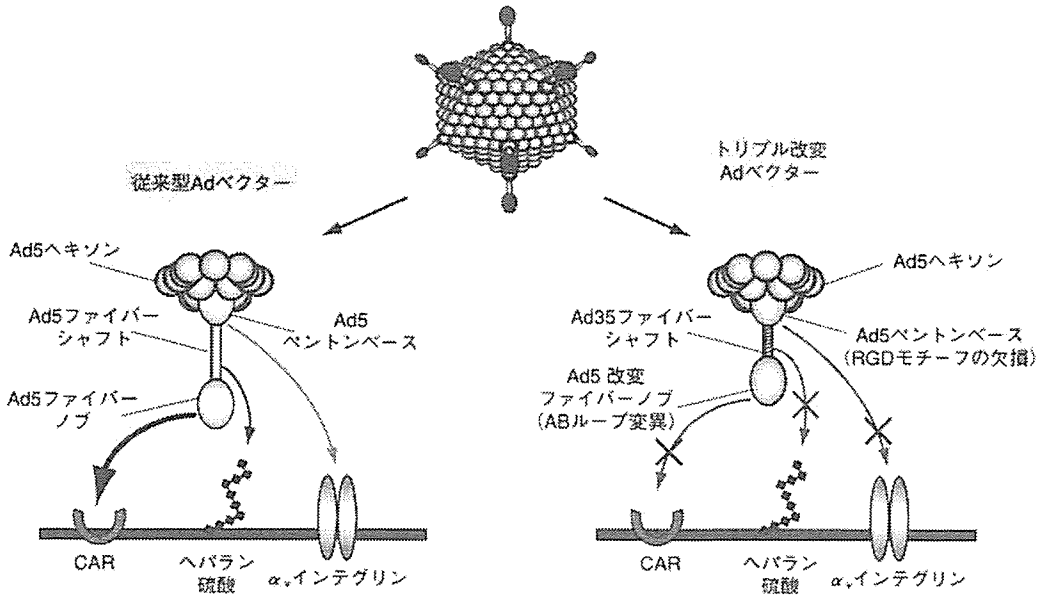


図2●ターゲティング能を有したアデノウイルスベクター

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，まず，①ファイバーノブと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α_v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たベクター（トリプル改変ベクター）を開発する必要がある．次に，トリプル改変ベクターに標的細胞特異的に結合するリガンドなどを付与することで，ターゲティング能を有したアデノウイルスベクターが開発できる

改変する①が最も基本的で重要な基盤技術になると考えられ，精力的に研究が進められている．

アデノウイルスは前述のようにファイバーとCARとの結合が感染に重要な役割を果たし，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モチーフやファイバーシャフトのKKTKからなるヘパリン結合ドメインが，α_vインテグリンやヘパラン硫酸と結合して起こる感染ルートも知られている[7]．また最近では，factor Xなどの血液成分がアデノウイルスと細胞との結合を橋渡しして，受容体非依存的に感染するルートも報告されている[8]．これらの感染経路を遮断して，標的細胞特異的に結合するリガンドなどをウイルス表面タンパク質のファイバーやヘキソン，protein Ⅸ領域*4（われわれはこれらの領域に簡便に外来リガンドを挿入する技術も開発済みである[9]）に付与すれば，ターゲティング能をもったアデノウイルスベクターが開発できる．われわれはファイバーノブ，シャフト，ペントンベースの3領域を同時に改変したトリプル改変ベクターを開発し（図2），このベクターが肝臓をはじめとする*in vivo*での遺伝子発現能をほとんど消失していることを明らかにしている[10][11]．現在このトリプル改変ベクターに，標的細胞特異的に高親和性を示すリガンドを付与することでターゲティング能をもったアデノウイルスベクターの開発を進めている．

2．免疫反応の制御

アデノウイルスベクターを生体に投与した場合，大別すると，①ベクター投与後数時間以内に生じるベクター粒子そのものに対する自然免疫，②7～10日以内に生じるベクターにより産生されたウイルスタンパク質（および外来遺伝子産物）に対する細胞性免疫，そして，③ウイルスタンパク質に対する液性免疫の3種類の免

＊4：protein Ⅸ領域
ヘキソンとヘキソンの間に存在するタンパク質．

疫反応が起こることが報告されている．これらの免疫反応を克服できるベクターや投与方法（投与戦略）の開発は，安全性や有効性の高い遺伝子治療の実現にとって必要不可欠である．

i）自然免疫の制御が可能な
　アデノウイルスベクターの開発

ウイルスをはじめとする異物を生体に投与すると，生体は即座にインターフェロンやサイトカイン，ケモカインなどを産生し，それらの異物を排除しようとする自然免疫が発動する．アデノウイルスベクターを生体に投与した場合にも自然免疫の活性化は生じ，1999年に米国で起こったオルニチントランスカルバミラーゼ欠損症に対するアデノウイルスベクターを用いた死亡事故では，自然免疫の過剰な活性化が原因と考えられている．

アデノウイルスベクターをマウスに全身投与した場合には，IL-6，IL-12などの産生が投与3時間以内に生じる．全身投与されたベクターの90％以上は肝臓（実質細胞とクッパー細胞*5をはじめとする非実質細胞）に移行するが，多くの炎症性サイトカインは肝臓（のクッパー細胞）ではなく，主に脾臓で分泌される[10]．したがって，脾臓への移行性を抑えたベクターは，炎症性サイトカインの産生が低い．例えば，前述したポリリジンでファイバーを修飾したアデノウイルスベクターでは，脾臓への移行性が減少する結果，血中へ分泌されるIL-6は約1/4にまで減少する（肝臓をはじめとする各臓器での遺伝子発現は従来型ベクターと同等以上に起こる）[12]．また，CAR，インテグリン，ヘパラン硫酸との結合性を欠損させたトリプル改変ベクターにおいては，IL-6はほとんど産生されない[11]．興味深いことに，従来のアデノウイルスベクターを投与した場合に生じるAST（aspartate aminotransferase）やALT（alanine transferase）などの肝傷害性マーカーの産生も，ポリリジン型ベクターやトリプル改変ベクターではほとんど全く起こらず[11][12]，安全性が高いことが明らかとなっている．

ウイルスなどの病原体を認識する細胞上のセンター受容体として，近年TLR（Toll Like Receptor）が注目されている．TLR3を除くTLRが利用しているアダプタータンパク質のMyD88欠損マウスを用いたわれわれの検討では，アデノウイルスベクター刺激による樹状細胞でのIL-6産生にはMyD88が関与するものの，マクロファージでのIL-6産生にはMyD88には関与せず，細胞種によりIL-6の産生メカニズムが異なっていることが明らかとなった[13]．さらに*in vivo*での血中IL-6の産生は，MyD88欠損マウスにおいても野生型マウスと同程度に起こり，TLR以外の経路が*in vivo*におけるIL-6産生に大きく寄与していることが示唆された．アデノウイルスベクター投与に伴う自然免疫に関与する生体側因子やウイルス側因子，シグナル伝達機構の解明は，自然免疫応答の克服に向けて重要な研究課題であり，われわれのグループでは，各種改変アデノウイルスベクターやノックアウトマウス，RNAi技術，マイクロアレイ解析を通して，これらの研究を進めている．

ii）細胞性免疫の制御が可能な
　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を生体に投与すると，通常数週間から数カ月間の一過性の遺伝子発現を示す．しかしながら，免疫不全マウスにおいては，数カ月から1年以上（場合によっては一生涯）にわたる長期間の遺伝子発現を示すことから*6，免疫系による遺伝子導入細胞の排除が一過性の遺伝子発現の原因と考えられている．すなわち，従来のアデノウイルスベクターは，ウイルスの増殖やウイルスタンパク質の合成に必須のE1遺伝子領域を除去することで，ウイルスタンパク質の産生が生じないように設計されているが，E1遺伝子非依存的に他のウイルスタンパク質の合成がわずかながら起こり，これが免疫系のターゲットとなることが明らかになっている．この問題を克服するために，ウイルスコード遺伝子をすべて除去したguttedアデノウイルスベクターが開発されており，本ベクターを

＊5：実質細胞とクッパー細胞
肝臓は肝実質細胞（肝細胞）の他に，クッパー細胞，類洞内皮細胞，星細胞，胆管上皮細胞などの肝非実質細胞から構成される．

＊6：
増殖停止期の終末分化した細胞に遺伝子導入した場合には，導入遺伝子が染色体外にエピゾームとして存在するアデノウイルスベクターにおいても長期間の遺伝子発現を示す．

用いた場合は，通常のマウスにおいても長期間の遺伝子発現が認められる[14]．従来は，高タイターのgutted アデノウイルスベクターの産生が技術的に難しいのが課題点であったが，最近はヘルパーウイルスとパッケージング細胞の改良により，その問題点は一部克服されつつある[15]．また，gutted アデノウイルスベクターに，Sleeping Beauty[16]やバクテリオファージインテグラーゼφC31[17]，レトロトランスポゾン[18]の染色体への遺伝子組み込み活性を付与することで，導入遺伝子が積極的に染色体に組み込まれる性質をもたせたアデノウイルスベクターの開発も進められており，このようなベクターでは分裂細胞においても永続的な遺伝子発現が期待できる．

iii）液性免疫の制御が可能な
　アデノウイルスベクターの開発

成人の約60％はヒト5型アデノウイルス（サブグループCに属する）に対する抗体を保持していることが知られている．また，アデノウイルスベクターを投与された個体は，抗アデノウイルス抗体を生じるため，2回目以降のベクターの全身投与では遺伝子発現をほとんど示さない*7．主要キャプシドタンパク質のヘキソンに対する抗体が液性免疫の主体であることから，ヘキソン改変ベクターが，この問題を克服するために開発されている[19]．また，異なった血清型（サブグループBに属する11型や35型）や異なった種（チンパンジー，イヌ，ヒツジ，トリ，ウシ，マウスなど）に属するアデノウイルスベクターが開発されており，これらのなかには，CAR以外の受容体を認識して感染するものもあり，感染域を変えることも可能になる．例えば，われわれはすべ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の開発に成功したが[13]，35型アデノウイルスに対する成人の抗体保持率は低く，本ベクターは5型アデノウイルス抗体存在下でも高い遺伝子発現を示す．35型アデノウイルスはCD46を受容体として感染し，造血幹細胞などの5型アデノウイルスベクターでの遺伝子導入が困難な細胞への遺伝子導入に優れていることが明らかとなっている[13,20]．

3．基礎研究への応用

アデノウイルスベクターはわれわれが開発したプラスミド構築に基づいた簡便なベクター作製法が開発されたこと[21,22]（クロンテック社よりキット化），高力価のウイルス液が得られること，遺伝子発現効率が高いことなどから，遺伝子機能解析などの基礎研究のための貴重なツールとして広く利用されている．さらに，前述した改良型ベクターにより，従来のベクターでは遺伝子導入が困難であった多くの細胞種への劇的な遺伝子導入効率の改善が可能になっており，汎用性は益々高くなっている．

アデノウイルスベクターは全身投与した場合には，肝臓に90％以上のベクターが移行し，100％の肝細胞で遺伝子発現が起こる．また，臓器局所にベクターを投与した場合には，投与部位での高効率な遺伝子発現が期待できる．目的組織がCAR陰性の場合は，ファイバーを改変したベクターを用いることで遺伝子発現効率の上昇が期待できる．例えば，CAR陰性のB16メラノーマの腫瘍内にベクターを投与した場合には，RGDペプチドを付与したファイバー改変ベクターでは従来型ベクターに比べ約40倍もの遺伝子発現を示す[23]．また，遺伝子導入が物理的な問題により容易でない膵臓ランゲルハンス島（膵島）β細胞に対しては，腹腔動脈からアデノウイルスベクターを *in vivo* 投与し，その後膵島を初代培養することで高効率な遺伝子発現が得られることが明らかとなっており（ランゲルハンス島の内部の細胞においても，高効率な遺伝子発現が得られる）[24]，糖尿病の分子メカニズムの解明や治療に向けた研究分野への強力なツールになると期待される．さらに，35型アデノウイルスの受容体であるCD46を全身の臓器で発現しているトランスジェニックマウス（CD46は齧歯類ではほとんど発現していない）を用いた各組織局所への35型ベクターを用いた遺伝子導入系は，基礎研究における実験系としてきわめて有効で

＊7：
局所投与された場合は，複数回の投与でも有効である．

ある[25]．

おわりに

本稿で紹介したように，アデノウイルスベクターの改良はさまざまな方向から精力的に進められている．最終的には，前述の各種改変技術を組み合わせたり，化学的手法によるベクター改変や組織特異的プロモーターの利用，導入する個々の遺伝子（あるいはsiRNA発現ベクターとして）の特性を考慮に入れて活用することで，アデノウイルスベクターは遺伝子治療への応用や基礎研究のツールとして益々有効な技術になると考えられる．今後，このような改良型アデノウイルスベクターの開発が，遺伝子治療臨床研究の成功や遺伝子治療の普及，さらには生命科学研究の発展という成果となって現れることを期待している．

参考文献

1）Bergelson, J. M. et al.：Science, 275：1320-1323, 1997
2）Okegawa, T. et al.：Cancer Res., 61：6592-6600, 2001
3）Mizuguchi, H. et al.：Gene Ther., 8：730-735, 2001
4）Koizumi, N. et al.：J. Gene Med., 5：267-276, 2003
5）Sakurai, F. et al.：Gene Ther., 10：1041-1048, 2003
6）Rea, D. et al.：J. Immunol., 166：5236-5244, 2001
7）Mizuguchi, H. et al.：Hum. Gene Ther., 15：1022-1033, 2004
8）Shayakhmetov, D. M. et al.：J. Virol., 79：7478-7491, 2005
9）Kurachi, S. et al.：Gene Ther., 14：266-274, 2007
10）Koizumi, N. et al.：J. Virol., 77：13062-13072, 2003
11）Koizumi, N. et al.：Hum. Gene Ther., 17：264-279, 2006
12）Koizumi, N. et al.：J. Immunol., 178：1767-1773, 2007
13）Yamaguchi, T. et al.：submitted
14）Donna, J. P. et al.：Hum. Gene Ther., 16：1-16, 2005
15）Palmer, D. et al.：Mol. Ther., 8：846-852, 2003
16）Yant, S. R. et al.：Nature Biotechnol., 20：999-1005, 2002
17）Ehrhardt, A. et al.：Mol. Ther., 15：146-156, 2007
18）Kubo, S. et al.：Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 103：8036-8041, 2006
19）Roberts, D. M. et al.：Nature, 441：239-243, 2006
20）Sakurai, F. et al.：Gene Ther., 12：1424-1433, 2005
21）Mizuguchi, H. et al.：Hum. Gene Ther., 9：2577-2583, 1998
22）Mizuguchi, H. et al.：Hum. Gene Ther., 10：2013-2017, 1999
23）Mizuguchi, H. et al.：Cancer Gene Ther., 9：236-242, 2002
24）Mukai, E. et al.：J. Cont. Rel., in press
25）Sakurai, F. et al.：Gene Ther., 13：1118-1126, 2006

水口裕之（Hiroyuki Mizuguchi）

独立行政法人医薬基盤研究所基盤研究部遺伝子導入制御プロジェクトプロジェクトリーダー．1991年大阪大学薬学部薬学科卒業，1996年大阪大学大学院薬学研究科博士課程修了（薬学博士），1996年大阪大学微生物病研究所研究員，1997年米国ワシントン大学医学部Senior Fellow（Dr. Mark A. Kay），1998年国立医薬品食品衛生研究所生物薬品部研究員，2002年同研究所遺伝子細胞医薬部主任研究官，2005年より現職．2005年より大阪大学大学院薬学研究科招聘助教授．ベクター開発研究を軸に，遺伝子治療学，再生医療（幹細胞生物学や細胞治療），免疫学，ウイルス学，分子生物学などとの境界領域の研究を展開中．筆者らと共にこの最も重要でチャレンジングな研究に参画してくれる熱意ある大学院生（修士・博士：大阪大学連携大学院）を募集中であり，気軽にお問い合わせ下さい．研究室HP（http://www.nibio.go.jp/Proj3HP/index.html）．

—Reviews—

免疫細胞の体内動態制御に基づいた癌免疫療法の最適化

岡田直貴,* 中川晋作

Optimization of Cancer Immunotherapy by Controlling Immune Cell Trafficking and Biodistribution

Naoki OKADA,* and Shinsaku NAKAGAWA
Department of Biopharmaceutics, Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Osaka University, 1-6 Yamadaoka, Suita City 565-0871, Japan

(Received May 31, 2006)

An immunosurveillance system for tumor-associated antigens (TAAs) plays an important role in the elimination of cancer cells during the initial stage. Although cancer immunotherapy targeting TAAs has progressed steadily with the development of various vaccine strategies, excellent therapeutic efficacy, as evidenced by marked tumor regression and complete response, has not been reported in a clinical setting to date. To improve the therapeutic effects of cancer immunotherapy, we are attempting to establish an innovative concept, the "cell delivery system," capable of better controlling the trafficking and biodistribution of immune cells by applying chemokine-chemokine receptor coupling, which regulates leukocytic migration and infiltration of local sites in the living body. This review introduces our approaches that employ an Arg-Gly-Asp (RGD) fiber-mutant adenovirus vector encoding the chemokine or chemokine receptor gene in cancer immunotherapy.

Key words——cell delivery system; chemokine-chemokine receptor coupling; cancer immunotherapy; adenovirus vector; tumor-infiltrating immune cell; dendritic cell

1. はじめに

腫瘍免疫学の進展によって，遺伝子変異を蓄積した癌細胞が正常細胞とは質的・量的に異なる腫瘍関連抗原（TAA）と呼ばれる分子を発現しており，TAA に対する免疫監視機構が初期癌細胞の排除という生体の恒常性維持に重要な役割を果たしていることが明らかとされた．これに伴って，TAA を標的とした免疫療法が次世代の癌治療戦略として世界的に活発に研究されており，基礎研究と臨床研究の連携によって着実な進歩を遂げている．しかしながら，腫瘍の完全退縮あるいは病状の寛解といった顕著な治療効果を報告した臨床研究はほとんど認められないのが現状であり，この一因として，従来の癌免疫療法研究の多くが腫瘍免疫の存在実証とその効率的な誘導法の探索を中心に進められ，効果的な治療を達成する上で必要な免疫エフェクター細胞の腫瘍組織への集積性改善という側面がいまだ十分に検討されていないことが挙げられる．つまり，癌細胞を殺傷する能力を有する免疫エフェクター細胞が例え患者体内に誘導されたとしても，それらが十分に腫瘍組織に移行・浸潤して癌細胞と接触できなければ，癌免疫療法の有効性は大きく制限されてしまうと考えられる．

また近年，免疫系を構成する細胞の機能解明が急速に進んだことによって，樹状細胞（DC）がT細胞依存性の獲得免疫応答の始動及び増幅，さらには自然免疫応答の制御をも含めて，免疫監視機構を多方面から統御する抗原提示細胞であることが明らかとされた．このような免疫学的特性に基づいて，TAA を導入した DC を "nature's adjuvant" として利用する細胞免疫療法が有望な新規癌治療戦略として精力的に研究されており，DC の腫瘍免疫誘導能を最大限に発揮させる方法論の探索が進められている．[1] 生体に投与した TAA 導入 DC ワクチンは，投与部位から所属リンパ組織へ移行することによっ

大阪大学大学院薬学研究科薬剤学分野（〒565-0871 吹田市山田丘 1-6）
*e-mail: okada@phs.osaka-u.ac.jp
本総説は，日本薬学会第 126 年会シンポジウム S33 で発表したものを中心に記述したものである．

て始めてT細胞への抗原提示・感作を行い一連の初期免疫応答を惹起する．すなわち，患者に投与したTAA導入DCワクチンのリンパ組織集積性が，DC免疫療法の治療効果を規定する要因の1つとして考えられる．しかし現在のDC免疫療法では，投与部位からリンパ組織に移行させるための最適なDCコンディショニングについて十分な検討がなされていないため，投与DCワクチンのうちリンパ組織に集積するものはわずか0.1—1%程度とされている．[2—4] したがって，TAA導入DCワクチンに高いリンパ組織移行能を付与することができれば，リンパ組織における免疫エフェクター細胞の活性化を増強することが可能であり，ひいてはDC免疫療法の有効性を飛躍的に改善できるものと期待される．

以上のような観点から筆者らは，癌免疫療法の有効性改善に貢献するアプローチとして，“Cell Delivery System”ともいうべき新たなコンセプトに基づいた免疫細胞の体内動態制御法の構築を試みている．本稿では，ケモカイン—ケモカインレセプター連関を応用した1）免疫エフェクター細胞の腫瘍集積性，並びに2）DCワクチンのリンパ組織集積性，を増強し得る方法論を紹介するとともに，これらCell Delivery Systemの癌免疫療法における有用性について概説する．

2. ケモカイン—ケモカインレセプター連関

癌免疫療法の有効性及び安全性を確保・向上するためには，生体内の免疫細胞あるいは細胞医薬として生体に投与（移入）する免疫細胞を「必要なときに，必要な場所に，必要な量」送達できるCell Delivery Systemの確立が必要とされる．しかし，生体を構成する約60兆個の細胞の秩序を保った移動・分布・配列等を制御する巧妙な仕組みに関する知見はいまだ乏しく，Cell Delivery Systemの構築へと展開できる基礎情報並びに基盤技術は限られている．現時点でCell Delivery Systemへの応用に最も利用価値の高い生命現象は，ケモカイン-ケモカインレセプター連関に基づいた免疫細胞の局所への遊走・浸潤制御機構であろう．

ケモカインは8—14 kDa程度の塩基性・ヘパリン結合性分泌タンパク群であり，種々の細胞接着分子と協調して炎症反応やリンパ球のホーミングを制御している（Fig. 1）．[5] 現在，ヒトでは約50種類のケモカインが同定されており，それらは保存された4つのシステイン残基のうちN末端の2個のシステインの位置からCケモカイン，CCケモカイン，CXCケモカイン，及びCX_3Cケモカインの4つのサブグループに分類されるスーパーファミリーを形成している．[6] また，すべてのケモカインは7回膜貫通Gタンパク質共役型レセプターを介して作用

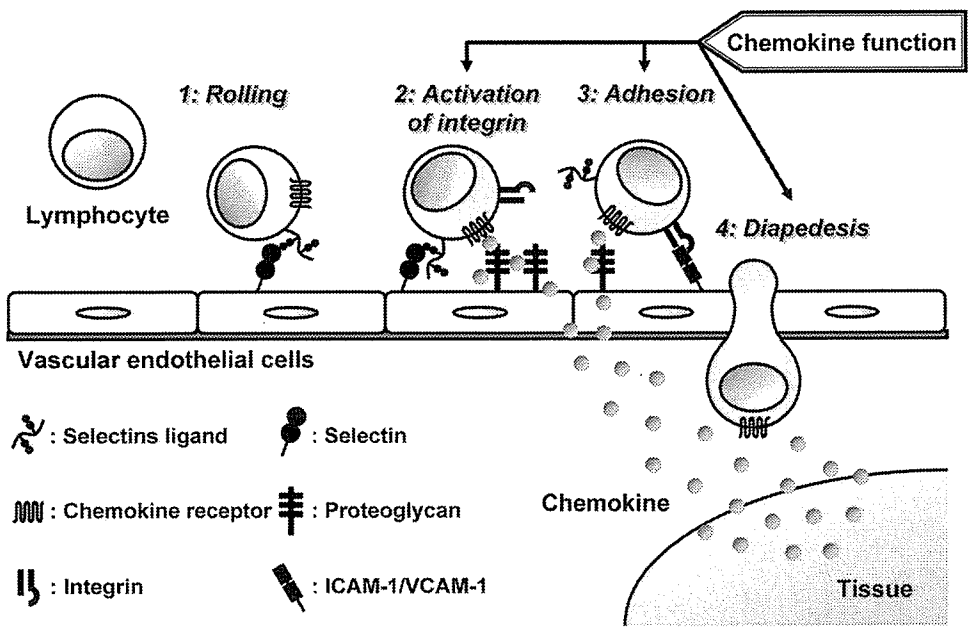


Fig. 1. Schematic Representation of Chemokine Functions in Tissue Infiltration of Lymphocyte

し，同定されている約20種類のケモカインレセプターもスーパーファミリーを構築している.[7,8] ケモカインは当初，好中球や単球を遊走させるサイトカインの一群として発見され，主に炎症での役割が研究されてきた．これら炎症性ケモカインに対して，1990年代後半より，バイオインフォマティクスを駆使してESTデータベースを検索するという手法によって新しいケモカインが次々と発見され，リンパ球やDCなどを標的細胞とする免疫系ケモカインの存在が明らかとなった（Table 1）．これによって，免疫細胞の生体内での移動や局在の制御機構に関する理解が急速に進展するとともに，ケモカイン—ケモカインレセプター連関を応用することによって免疫細胞の体内動態・体内分布を制御し得る新たな癌免疫療法の開発に足掛かりができた．

3. RGDファイバーミュータントアデノウイルス（AdRGD）ベクター

ケモカイン—ケモカインレセプター連関を利用したCell Delivery Systemを実現するためには，生体内局所あるいは生体に投与する細胞医薬にケモカインやケモカインレセプターを豊富かつ持続的に発現させる必要があり，遺伝子導入技術はそれらを満足する有力な手段である．アデノウイルス（Ad）ベクターは，現存する遺伝子導入ベクターの中で最も高い遺伝子導入効率を誇り，かつ高力価のベクター調製が容易であることから*in vivo*直接投与への応

Table 1. Chemokine-Chemokine Receptor Coupling in Immune Cell Trafficking

Immune cell subset	Chemokine receptor expression	Corresponding chemokines
Naive T cell	CCR7	CCL19, 21
	CXCR4	CXCL12
Th1	CCR2	CCL2, 7, 13
	CCR5	CCL3, 4, 5
	CXCR3	CXCL9, 10, 11
	CXCR6	CXCL16
	CX_3CR1	CX_3CL1
Th2	CCR2	CCL2, 7, 13
	CCR3	CCL5, 7, 8, 11, 13, 24, 26
	CCR4	CCL17, 22
	CCR8	CCL1
CTL	CCR5	CCL3, 4, 5
	CXCR1	CXCL6, 8
	CXCR2	CXCL1, 2, 3, 5, 6, 7, 8
	CXCR3	CXCL9, 10, 11
	CXCR6	CXCL16
	CX_3CR1	CX_3CL1
Memory T cell	CCR1	CCL3, 5, 7
	CCR2	CCL2, 7, 13
	CCR4	CCL17, 22
	CCR6	CCL20
	CCR7	CCL19, 21
	CCR10	CCL27
	CXCR1	CXCL6, 8
	CXCR2	CXCL1, 2, 3, 5, 6, 7, 8
	CXCR4	CXCL12
B cell	CCR6	CCL20
	CCR7	CCL19, 21
	CXCR3	CXCL9, 10, 11
	CXCR4	CXCL12
	CXCR5	CXCL15
NK cell	CCR1	CCL3, 5, 7
	CCR2	CCL2, 7, 13
	CCR4	CCL17, 22
	CCR5	CCL3, 4, 5
	CCR7	CCL19, 21
	CCR8	CCL1
	CXCR1	CXCL6, 8
	CXCR2	CXCL1, 2, 3, 5, 6, 7, 8
	CXCR3	CXCL9, 10, 11
	CXCR4	CXCL12
	CXCR6	CXCL16
	XCR1	XCL1
	CX_3CR1	CX_3CL1
Monocyte	CCR1	CCL3, 5, 7
	CCR2	CCL2, 7, 13
	CCR5	CCL3, 4, 5
	CCR8	CCL1
	CXCR2	CXCL1, 2, 3, 5, 6, 7, 8
	CXCR4	CXCL12
	CX_3CR1	CX_3CL1
Immature DC	CCR1	CCL3, 5, 7
	CCR2	CCL2, 7, 13
	CCR3	CCL5, 7, 8, 11, 13, 24, 26
	CCR5	CCL3, 4, 5
	CCR6	CCL20
	CCR9	CCL25
	CXCR4	CXCL12
Mature DC	CCR7	CCL19, 21
	CCR9	CCL25
	CXCR4	CXCL12

用も図り易いという利点を有している．しかし，Ad ベクターが標的細胞内に侵入するには，ファーストステップとして細胞表面上の感染受容体（coxsackievirus-adenovirus receptor; CAR）に結合する必要があり，[9,10] 一部の癌細胞，血球系細胞及び幹細胞においては CAR の発現が乏しいあるいは欠損しているために，Ad ベクター介在性遺伝子導入に抵抗性を示すことが知られている．この問題点を克服した次世代型ベクターシステムの 1 つが AdRGD ベクターであり，α_v-integrin に親和性を有する RGD（Arg-Gly-Asp）配列を Ad ベクターのカプシドタンパク質（ファイバー領域）に表現させることによって感染域の拡大を図り，CAR 低発現の細胞・組織にも極めて効率よく遺伝子導入することが可能となった（Fig. 2）．[11] 実際に，CAR 低発現のマウス B16BL6 メラノーマ細胞並びにマウス骨髄由来 DC への AdRGD ベクターによる遺伝子導入効率を従来型 Ad と比較してみると，Fig. 3 に示すように従来型 Ad ベクターでは両細胞への遺伝子導入効率は 20％にも満たないレベルであったのに対して，AdRGD ベクターでは 90％以上もの効率で外来遺伝子を発現させることができた．[12—14] そこで，種々のケモカイン遺伝子あるいはケモカインレセプター遺伝子の発現カセットを搭載した AdRGD ベクターを構築し，これらを用いた免疫細胞の体内動態制御法の確立と癌免疫療法への応用を試みた．

4. 免疫エフェクター細胞の腫瘍集積性の増強

免疫細胞の腫瘍組織内浸潤率と癌患者の予後を調査した結果から，原発腫瘍に多くの免疫細胞が集積している症例では，治療後の再発あるいは転移が高率に抑制されるという相関が報告されており，[15—17] 免疫系による腫瘍細胞認識を促進させる方法論の開発が癌の治癒率の向上にいかに重要であるかをうかがわせる．また，T 細胞，特に細胞傷害性 T 細胞（CTL），が腫瘍免疫における最も強力なエフェクター細胞であると広く考えられており，[18—20] これまでの癌免疫療法研究によって腫瘍特異的 CTL を効率よく誘導できる様々なワクチン戦略が提案されている．しかし，腫瘍細胞のケモカイン産生レベルは正常細胞よりも低いことや，[21] 腫瘍組織に新生された血管内皮細胞には接着分子がほとんど発現していない[22]などの理由から，癌免疫療法によって活性化された免疫エフェクター細胞は一般的に腫瘍組織内に十分に集積することができない．したがって，免疫細胞の局所への遊走・浸潤を制御するケモカインを利用することによって腫瘍組織内への免疫細胞の集積を増強しようとする試みは，効果的な癌免疫療法の開発において非常に魅力的な手段であると言

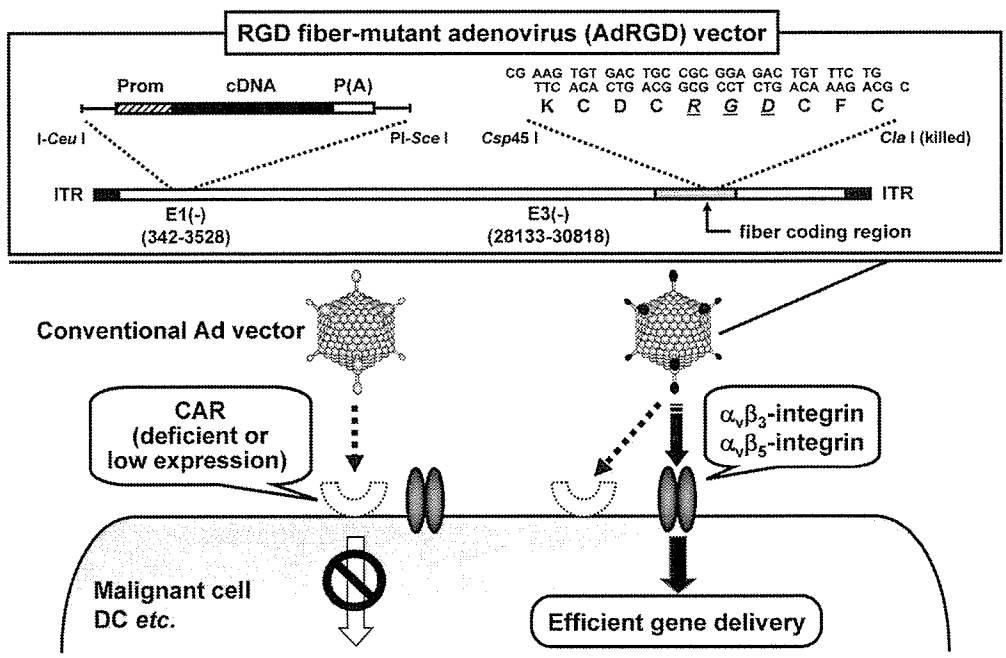


Fig. 2. Construct and Tropism of RGD Fiber-mutant Adenovirus (AdRGD) Vector
ITR: inverted terminal repeat, Prom: promoter, P(A): polyadenylation signal, CAR: coxsackievirus-adenovirus receptor.

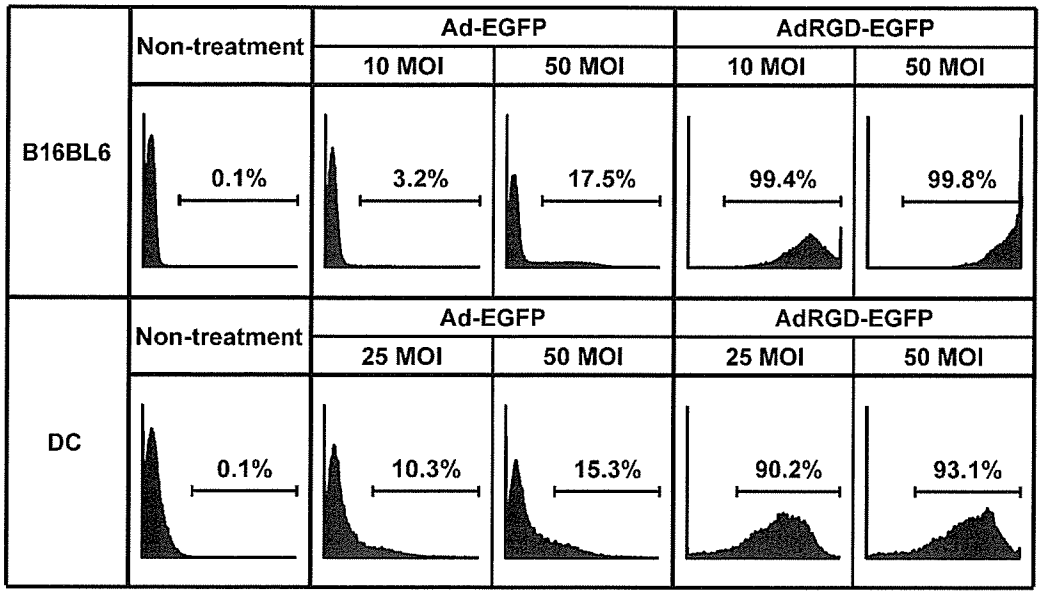


Fig. 3. EGFP Expression in Murine B16BL6 Cells and DCs Transduced with EGFP cDNA by AdRGD or Conventional Ad Vector
B16BL6 cells and DCs were transfected for 2 h with Ad-EGFP or AdRGD-EGFP at the indicated MOI (multiplicity of infection). Two days later, EGFP expression in cells was evaluated by flow cytometric analysis. The % value expresses the percentage of EGFP-positive cells.

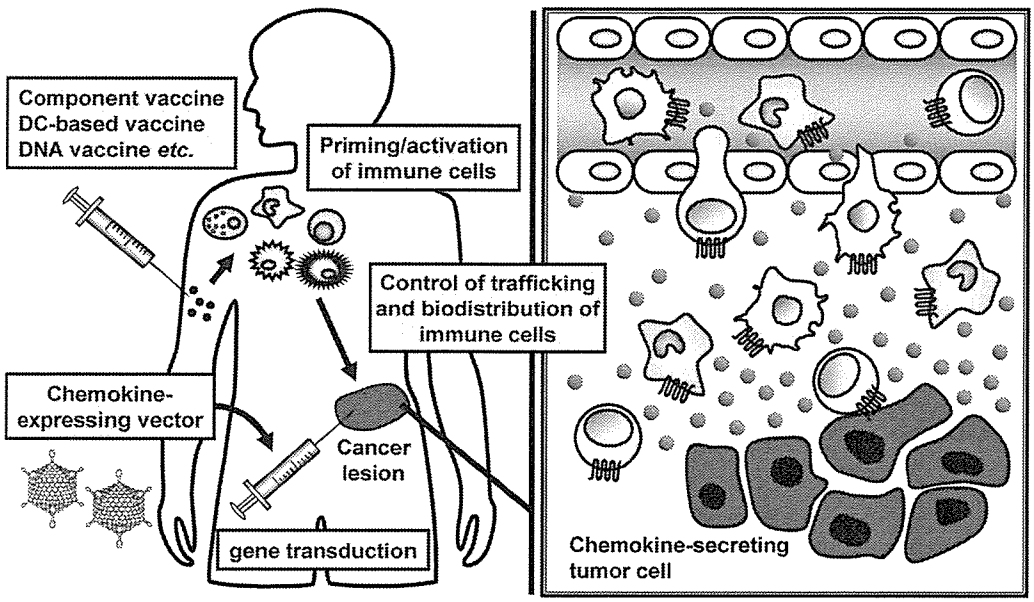


Fig. 4. Conceptual Representation of *In vivo* Chemokine Gene Transduction to Manipulate Immune Cell Trafficking and Biodistribution in Cancer Immunotherapy

えよう（Fig. 4）．そこで筆者らは，目的遺伝子の搭載が簡便であるとともに，広範な種類の腫瘍細胞に対して非常に効率よく遺伝子導入することができる AdRGD ベクターを駆使することによって，種々の免疫系ケモカインを発現させた腫瘍の免疫細胞浸潤度と治療効果との連関を網羅的に解析した．[23—27] それらの中から本稿では，マウス B16BL6 腫瘍モデルにおいて CCL17 及び CCL19 を発現する AdRGD ベクター（AdRGD-CCL17, AdRGD-CCL19）を用いた検討結果について紹介する．

まず，マウスの腹部皮内に生着させた B16BL6 腫瘍に AdRGD-CCL17 あるいは AdRGD-CCL19 を投与し，2 日後における免疫細胞の腫瘍実質内浸潤度を免疫組織染色により解析したところ（Fig. 5

(A)), AdRGD-CCL19 投与腫瘍においては，コントロールベクター（ルシフェラーゼ発現 AdRGD ベクター；AdRGD-Luc）を投与した腫瘍と比較して $CD3^+$ T 細胞の著しい浸潤増加が観察された．また，これら T 細胞のサブセット解析の結果から，AdRGD-CCL19 の投与によって腫瘍内には $CD4^+$ ヘルパー T 細胞と $CD8^+$ CTL がともに集積していることも判明した．一方，AdRGD-CCL17 を投与した腫瘍ではコントロール群と比較して有意な T 細胞数の増加を認めなかった．このように腫瘍組織への T 細胞動員能が大きく異なる CCL17 と CCL19 ではあるが，Fig. 5 (B) に示すように AdRGD-CCL17 あるいは AdRGD-CCL19 の投与は B16BL6 腫瘍の増殖をコントロール群と比較してわずかに遅延させたのみであり，ケモカイン両群間の抗腫瘍効果に明らかな差は認められなかった．筆者らはこの一見矛盾する結果に対して，腫瘍組織に発現させた CCL19 によって動員される T 細胞が腫瘍細胞を排除する活性に乏しい未感作（naive）な状態であったために，効果的な腫瘍退縮が観察されなかったのではないかと考えた．事実，CCL19 に対応するケモカインレセプターである CCR7 は，T 細胞サブセットの中でも主に naive T 細胞に発現することが知られており（Table 1），また活性化 T 細胞の細胞傷害分子の 1 つであるパーフォリンに対する免疫組織染色において，CCL19 により腫瘍内に動員された T 細胞の大半がパーフォリン陰性であることを確認している．したがって，ケモカイン遺伝子の腫瘍内導入に基づいた免疫細胞の腫瘍内浸潤増強（Cell Delivery System）を癌免疫療法の開発に活かすためには，免疫細胞を腫瘍特異的に活性化し得るワクチン戦略との併用によってこそ真価が発揮されるであろうと考えられた．

そこで，B16BL6 腫瘍の TAA の 1 つである gp100 の遺伝子を導入した DC ワクチン（gp100/DC）を免疫投与することによって，gp100 特異的 CTL が感作・活性化された状態の担癌マウスを作成し，その後ケモカイン発現 AdRGD ベクターを腫瘍内投与した際の治療効果とそのメカニズムを解析した．Figure 6 (A) に示すように，B16BL6 腫瘍を接種したマウスに gp100/DC を皮内投与し，その後 PBS あるいはコントロールベクターを腫瘍内投与した群では効果的な腫瘍退縮は認められず，この結果はひとたび増殖を始めた B16BL6 腫瘍を

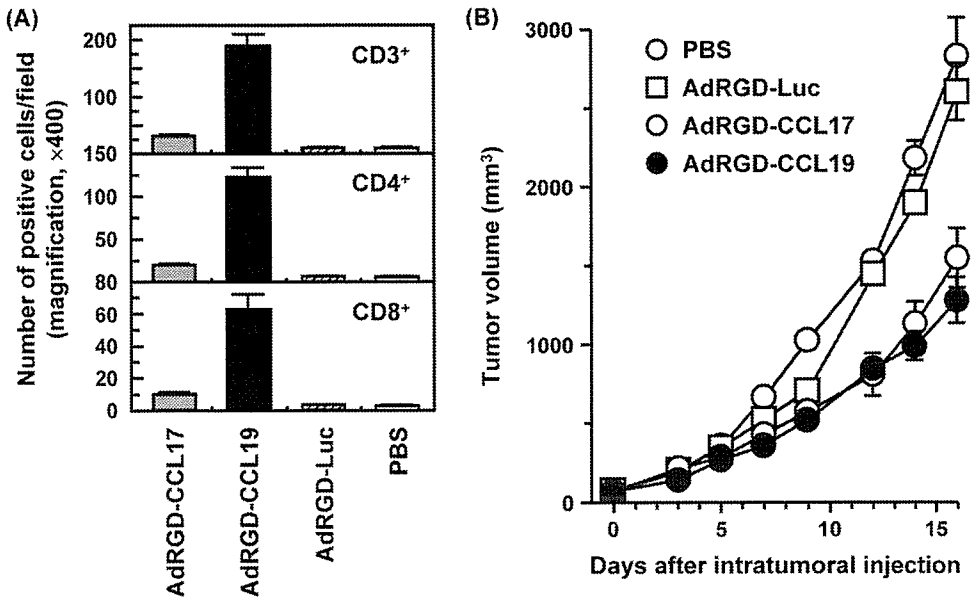


Fig. 5. T Cell Infiltration (A) and Growth Suppression (B) in B16BL6 Tumors Injected with AdRGD-CCL17 or AdRGD-CCL19

B16BL6 cells were intradermally inoculated into the right flank of C57BL/6 mice at 4×10^5 cells/mouse. One week later, tumors (5—7 mm in diameter) were injected with AdRGD-CCL17, AdRGD-CCL19, or AdRGD-Luc (control vector) at 3×10^8 PFU (plaque-forming unit). PBS was administered to control tumors. (A): On day 2 after intratumoral injection, immunohistochemical staining against CD3 (pan-T marker), CD4 (helper T marker), and CD8 (CTL marker) was performed using frozen tumor sections. Then, the number of positive cells in tumor parenchyma was assessed by counting six fields per specimen under ×400 magnification. (B): The tumor sizes were assessed using microcalipers, and the tumor volume was calculated using the following formula: (tumor volume [mm^3]) = (major axis [mm]) × (minor axis [mm])^2 × 0.5236.

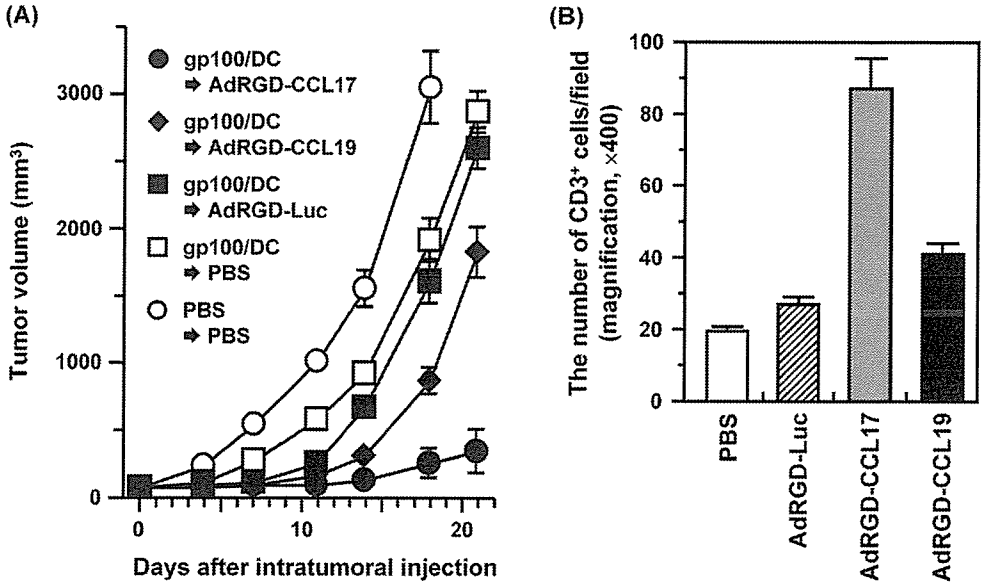


Fig. 6. Growth Suppression (A) and T Cell Infiltration (B) in B16BL6 Tumors of Mice Treated with the Combination of gp100/DC-immunization and Intratumoral Injection of Chemokine-expressing AdRGD Vector

B16BL6 cells were intradermally inoculated into the right flank of C57BL/6 mice at 4×10^5 cells/mouse. One day later, the mice were intradermally immunized in the left flank with 10^6 DCs transduced with AdRGD-gp100 at 25 MOI. Then, the tumors (5—7 mm in diameter) were injected with AdRGD-CCL17, AdRGD-CCL19, or AdRGD-Luc (control vector) at 3×10^8 PFU. PBS was administered to control tumors of mice immunized with gp100/DCs or PBS. (A): The tumor volume was assessed as described in the legend to Fig. 5. (B): In mice immunized with gp100/DCs, immunohistochemical staining against CD3 to determine T cells was performed with frozen tumor sections on day 2 after intratumoral injection with each AdRGD vector or PBS. The number of CD3-positive cells in tumor parenchyma was assessed by counting six fields per specimen under ×400 magnification.

gp100/DC の単回免疫投与だけで抑制することは非常に困難であることを示している．これに対して，gp100/DC 免疫後に AdRGD-CCL17 を腫瘍内投与した場合には，極めて強力な腫瘍増殖抑制効果が観察され，AdRGD-CCL17 投与 2 日後における腫瘍組織にはコントロール群と比較して顕著な $CD3^+$ T 細胞の浸潤増加が検出された（Fig. 6(B)）．一方，gp100/DC を免疫投与した担癌マウスに AdRGD-CCL19 を腫瘍内投与した場合には，腫瘍増殖のわずかな遅延が観察されたのみであり，腫瘍浸潤 T 細胞数もコントロール群と比較して若干の増加を認めるのみであった．これらの結果は，Fig. 5 に示したケモカイン発現 AdRGD ベクターの腫瘍内投与だけを施した際の抗腫瘍効果及び腫瘍浸潤 T 細胞数の結果とは全く異なる傾向を示し，免疫細胞のケモカイン応答性（ケモカインレセプターの発現パターン）が自身の分化・活性化とともに変化することを考え合わせると，有効な治療プロトコールを確立するためには腫瘍内に発現させるケモカインの種類を併用する癌免疫療法の特性（宿主免疫細胞の活性化状態）を考慮して選択する必要があることを示唆している．また，ケモカイン遺伝子を導入した腫瘍内へ集積する免疫細胞のサブセット並びに細胞数を，これまでに報告されている *in vitro* 解析に基づいた特定のケモカインと標的細胞との対応関係から予測することは極めて困難であり，これらは，発現したケモカインの作用・腫瘍組織の環境要因・集積した免疫細胞による二次的な作用・宿主免疫系の活性化状態などを包含した複合的イベントとして決定されると考えられた．したがって，ケモカインを応用した有効な癌免疫療法を開発するためには，腫瘍組織内への免疫細胞の集積性増強ばかりでなく，腫瘍局所に集積した免疫細胞を腫瘍特異的に活性化するためのサイトカイン療法や細胞療法の併用をも視野に入れた取り組みが必要であろうと思われる．

以上に紹介した筆者らの研究成果は，ケモカインを利用した腫瘍浸潤免疫細胞の増強（Cell Delivery System）が癌免疫療法の有効性改善に大いに貢献できるアプローチであることを実証するものであり，今後，免疫系におけるケモカイン—ケモカインレセプター連関のより詳細な解明に伴って，免疫エフェクター細胞の緻密な体内動態制御を導入した有効かつ安全な癌免疫療法の開発に結びついていくものと期待している．

5. DCワクチンのリンパ組織集積性の増強

骨髄幹細胞に由来するDCは生体内に広く分布しており，外来性の病原体や内在性の変異細胞（癌細胞・ウイルス感染細胞）断片を捕食すると，それらに含まれるタンパク抗原をペプチドにまでプロセッシングして細胞表面の主要組織適合遺伝子複合体（MHC）分子上に提示する．さらに，輸入リンパ管を介して最寄りのリンパ組織へと遊走し，リンパ組織に存在するT細胞を抗原特異的に感作・活性化することにより病原体や変異細胞の排除に働くCTLを増幅する．[28,29] DCをワクチン担体として利用する癌免疫療法は，患者から単離したDC前駆細胞を*in vitro*培養系においてDCへと増殖・分化させ，TAA導入処理を施したDCを患者に投与することによって，DCが誘発する一連の免疫応答の活性化に基づいた癌治療を達成しようとするものである（Fig. 7）．本療法の一部のプロトコールについては既に臨床試験も開始されているが，残念ながら劇的な有効性は報告されておらず，現在，DCワクチンの免疫誘導能を最大限に発揮させる調製法の探索が筆者らを含めて多くの研究グループによって進められている．[30—35] 前述の通りAdRGDベクターは，DCに対しても他のベクターシステムと比較して圧倒的に優れる遺伝子導入効率を有することから，筆者らは，AdRGDベクターを応用してTAA遺伝子を効率よく導入したDCワクチンの創製が，これまでDCに対する低いTAA導入効率によって制限されていたDC癌免疫療法の有効性を飛躍的に改善できることを報告してきた．[12,32,33] また，AdRGDベクターはDCへの抗原遺伝子デリバリーのみならず，従来の遺伝子導入法では困難とされてきた種々の機能修飾を目的とする遺伝子改変DCワクチンの創製をも可能とする．[34] したがって，AdRGDベクターを用いたDCへの効率的な遺伝子導入は，臨床的に最適なDCワクチンを設計・開発するためのブレークスルー的な手法になり得ると期待される．このコンセプトに基づいて筆者らは，ケモカインレセプター遺伝子を搭載したAdRGDベクターを応用することにより，生体に投与するDCワクチンの体内動態を操作し，より効果的なDC癌免疫療法の開発へと発展させるという独自のアイデアを実践している．[36] その一例として，CCケモカインレセプター7（CCR7）遺伝子を導入することでリンパ組織移行性を増強したDCワクチンの創製とその癌免疫療法における有用性を紹介する．

生体内に存在するDCの末梢組織からリンパ組織への遊走は，抗原認識・捕捉や炎症反応に伴って成熟分化したDCにCCR7が一過性に発現し，リンパ組織から構成的に産生・分泌されているCCL21に応答することによって誘発されるというコンセン

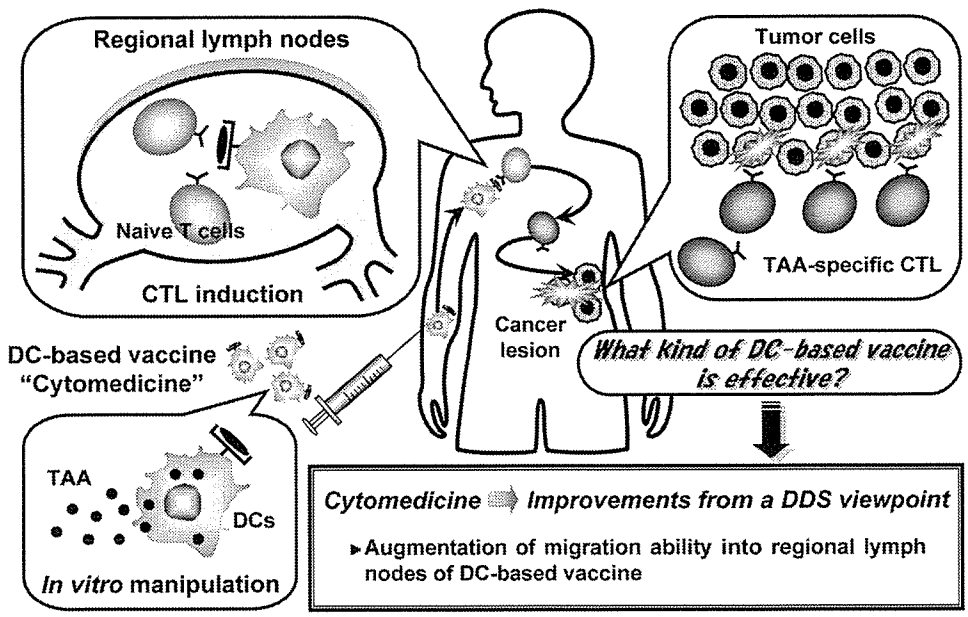


Fig. 7. Schematic Representation of DC-based Cancer Immunotherapy

サスが得られている.[37,38] したがって，抗原導入とともに CCR7 を十分に発現させた DC ワクチンは，生体に投与したあとに積極的にリンパ組織へと移行して免疫系を効率よく活性化できることが強く予測され，この“リンパ組織指向性 DC”ともいうべき新たなワクチンの創製手段として DC への CCR7 遺伝子導入が挙げられる（Fig. 8）．そこでまず，CCR7 遺伝子搭載 AdRGD ベクター（AdRGD-CCR7）を用いて遺伝子導入した DC（CCR7/DC）における CCR7 発現レベルを flow cytometry により解析したところ，90％以上の DC で細胞表面に豊富な CCR7 タンパク発現が確認された（Fig. 9（A））．また，*in vitro* chemotaxis assay において CCR7/DC は CCL21 の濃度に依存した遊走活性の上昇を示したことから，遺伝子導入によって細胞膜上に強制発現させた CCR7 タンパクは，CCL21 濃度を感知して DC に遊走刺激を伝える本来の生物活性を保持したケモカインレセプターであることも判明した（Fig. 9(B)）．さらに，CCR7/DC をマウスの側腹部皮内に投与し，48 時間後に投与部位から所属リンパ節（鼠径部リンパ節）へと遊走した DC 数を解析したところ，コントロール DC と比較して 5—15 倍高いリンパ節への集積が認められた（Fig. 9(C)）．これらの結果は，AdRGD ベクターを応用した DC へのケモカインレセプター遺伝子の導入によって，DC のケモカイン応答性並びに生体に投与した際の体内挙動を改変できることを示すとともに，CCR7/DC が，DC 免疫療法における効率のよい免疫エフェクター細胞の活性化と全身への迅速なエフェクター細胞の供給という観点から，非常に優れたワクチン担体として機能することを示唆するものである．

そこで，CCR7/DC の優れたリンパ組織集積性と DC 免疫療法の有効性改善との関連性を検証するために，メラノーマ関連抗原（gp100）遺伝子と CCR7 遺伝子とを共導入した DC（gp100＋CCR7/DC）を調製し，マウス B16BL6 メラノーマモデルにおけるワクチン機能を解析した（Fig. 10(A)）．Mock DC あるいは CCR7/DC を投与した群と比較して，gp100 遺伝子のみを導入した DC（gp100/DC）をワクチン投与したマウスにおいては攻撃接種した B16BL6 腫瘍の顕著な増殖遅延が観察され，さらに gp100＋CCR7/DC を免疫した群においてはより強力な腫瘍増殖抑制効果が認められた．また，これらの遺伝子導入 DC ワクチンを投与したマウスにおける CTL 活性を比較したところ，gp100

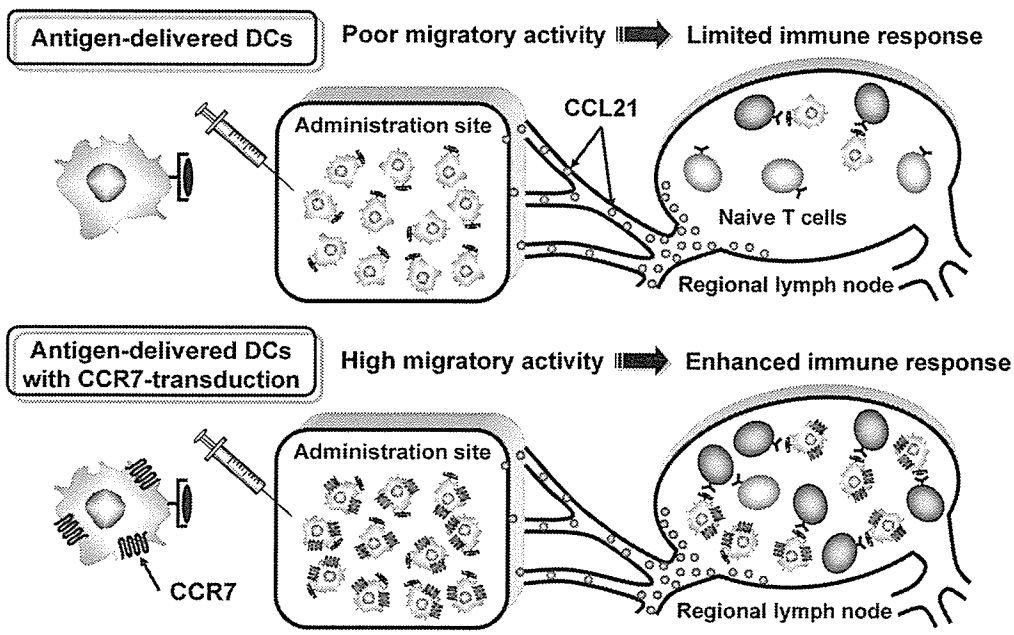


Fig. 8. Conceptual Representation of “Lymphoid Tissue-directivity DC” Vaccine Created by CCR7 Gene-transduction

The migration of DCs from administration site to regional lymph nodes is critical for the priming of T cells in DC-based immunotherapy. However, the poor migratory ability of antigen-delivered DCs limits the induction of a potent immune response. On the other hand, DCs transduced efficiently with the CCR7 gene may adequately respond to CCL21, which is constitutively released from lymphoid tissue, and acquire migratory ability to lymph nodes. Consequently, antigen-delivered DCs with CCR7 transduction can enhance the initiation and amplification of the T cell-dependent immune response.

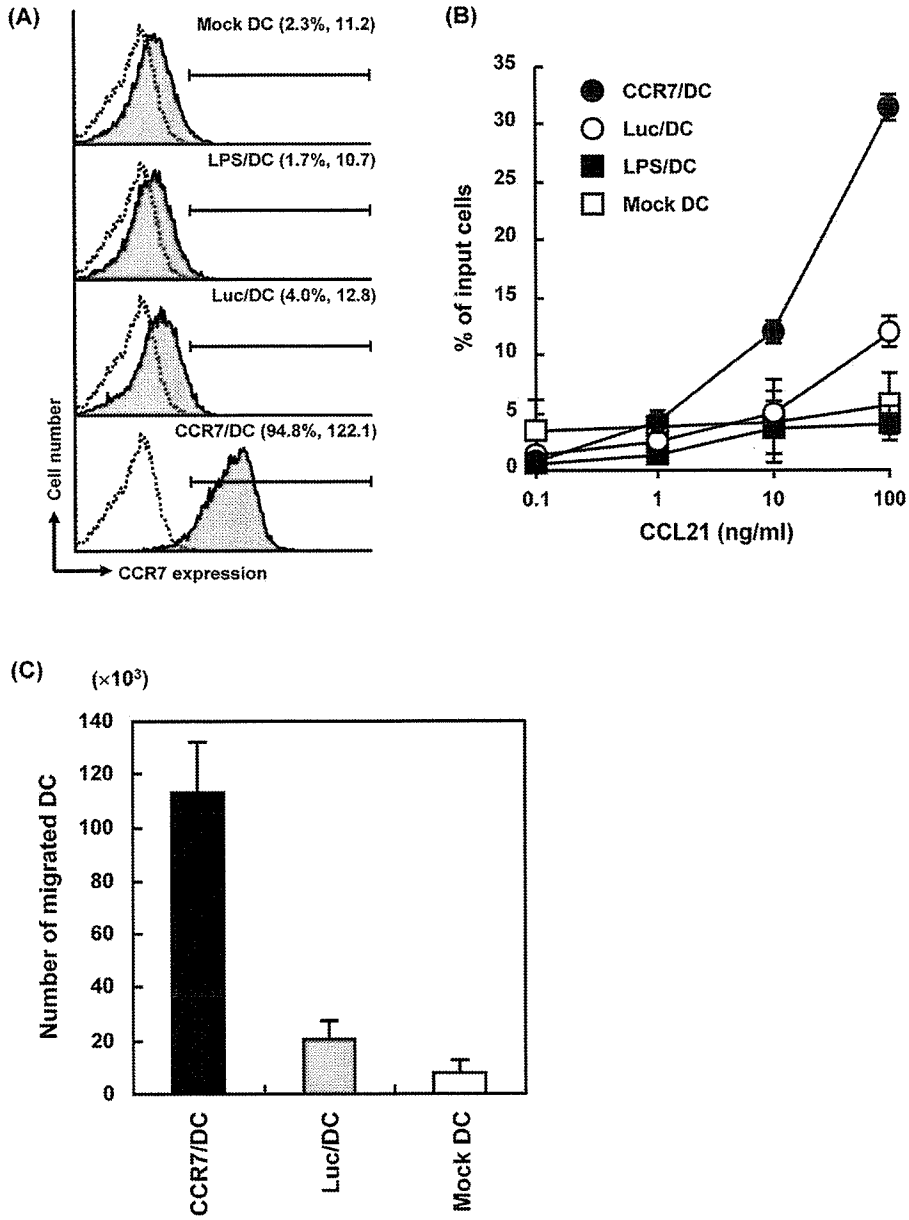


Fig. 9. Analysis for CCR7 Expression Levels (A), *In vitro* Chemotaxis (B), and *In vivo* Migration (C) of CCR7/DCs

DCs were transduced with AdRGD-CCR7 or AdRGD-Luc at 50 MOI. These transduced cells (CCR7/DC and Luc/DC), LPS/DCs stimulated with 1 μg/ml lipopolysaccharide, and mock DCs were cultured for 24 h. (A): Flow cytometric analysis was performed by using anti-mouse CCR7 antibody. Negative control (dotted line) represents mock DCs stained by second antibody alone. The % value and the numerical value indicated in the upper part of each panel express % of gated cells and mean fluorescence intensity (MFI), respectively. (B): *In vitro* chemotaxis assay was performed by a Chemotaxicell-24 installed on 24-well culture plate. CCL21 solution was added in the lower compartment at the indicated concentration, and DCs were placed in the upper chamber at 10^6 cells. After 4 h-incubation, the number of cells that migrated to the lower compartment was counted. The chemotactic activity was expressed in terms of the percentage of the input cells calculated by the following formula: (% of input cells) = (the number of migrated cells) / (the number of cells placed in Chemotaxicell-24 [10^6 cells]) $\times$100. (C): DCs derived from EGFP-transgenic mice were transduced with AdRGD-CCR7 or AdRGD-Luc at 50 MOI, and then were intradermally injected into the left flank of C57BL/6 mice at 2×10^6 cells/50 μl. Two days later, the draining inguinal lymph nodes were collected from these mice, and a single cell suspension was prepared. The abundance of EGFP-positive DCs was assessed by flow cytometric analysis acquiring 500000 events. The number of DCs that had migrated into draining lymph nodes was calculated by multiplying the EGFP-positive DC-frequency by the total number of isolated lymph node cells.

＋CCR7/DC を投与したマウスの脾細胞中には gp100/DC 投与群を上回る B16BL6 特異的細胞傷害活性が検出された (Fig. 10(B))．これらの結果は，CCR7-CCL21 連関を利用した DC ワクチンへの積極的なリンパ組織移行能の付与（Cell Delivery System）が，細胞医薬としての DC ワクチンの生物学的利用能を向上させることを意味しており，DC 免疫療法の臨床応用実現に貢献する有益な基礎情報を提供できるものと考えている．

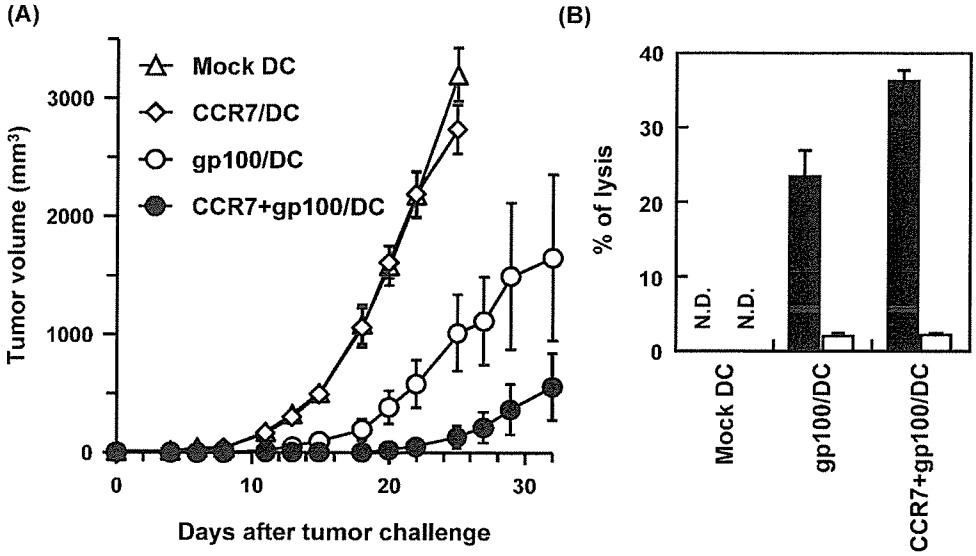


Fig. 10. Anti-B16BL6 Tumor Efficacy (A) and CTL Activity (B) in Mice Immunized with DCs Cotransduced with CCR7 and gp100 Gene by AdRGD

CCR7/DCs, gp100/DCs, and gp100+CCR7/DCs were prepared using corresponding AdRGD vectors at 25 MOI, and then cultured for 24 h. C57BL/6 mice were immunized by intradermal injection of 5×10^5 transduced DCs or mock DCs into the left flank. (A): One week later, 4×10^5 B16BL6 cells were inoculated into the right flank of the mice, and then the tumor volume was assessed as described in the legend to Fig. 5. (B): At 1 week after immunization, non-adherent splenocytes were prepared from these mice, and then were re-stimulated *in vitro* for 5 days with IFN-γ-stimulated and mitomycin C-inactivated B16BL6 cells. A cytolytic assay using the re-stimulated splenocytes (effector cells) was performed against IFN-γ-stimulated B16BL6 (closed column) or EL4 cells (open column) at effector/target ratio at 25. N.D.: not detectable.

6. おわりに

近年の免疫学及び分子生物学の著しい進展に伴い，免疫系を構築する細胞や分子の情報ネットワークが詳細に解明されつつあり，さらにDCやCTLなど免疫機能細胞を医薬品として捉えた細胞療法の研究が精力的に推し進められている．しかし，これら細胞医薬自身の体内動態制御あるいは細胞医薬により活性化された免疫細胞の体内動態制御によって治療効果の改善を目指した研究は，いまだ緒に就いたばかりであり，癌免疫療法へと展開するために必要とされる基礎的な情報さえ不足しているのが現状である．筆者らは，本稿で紹介したケモカイン—ケモカインレセプター連関を利用したCell Delivery Systemのみならず，アポトーシス抑制機構を利用した細胞医薬の生体内安定性（生存性）の向上，抗原—抗体反応を利用した細胞医薬への標的指向性の付与，といった様々なCell Delivery Systemの開発を試みており，これらが免疫療法に留まらず，細胞機能によって疾病治療を達成しようとする次世代医療（再生療法，*ex vivo* 遺伝子治療など）の現在の治療限界を切り崩す有望な方法論となるものと考えている（Fig. 11）．これら次世代医療の臨床応用に向けてはまだまだ長い道のりが待っており，治療法の理論的根拠，有効性・安全性の評価基準，遺伝子医薬や細胞医薬の性能・品質管理など，従来の低分子有機化合物を用いた薬物治療がなし遂げてきたような厳しい基準をクリアしていくことが要求される．現在はこれら多岐に渡る検討課題を個々に克服している段階であるが，筆者らのCell Delivery Systemがより確かな次世代医療を実現するための一助となることを期待する．

謝辞　本研究の遂行に有益な御助言及び多大な御支援を賜りました水口裕之先生（医薬基盤研究所基盤研究部遺伝子導入制御プロジェクトプロジェクトリーダー，大阪大学大学院薬学研究科招聘助教授），山本　昌先生（京都薬科大学薬剤学教室教授），並びに藤田卓也先生（京都薬科大学薬剤学教室助教授）を始めとする共同研究者の先生方，及び実験に御協力頂きました大学院生・学生諸氏に厚く御礼申し上げます．なお本研究の一部は，文部科学省科学研究費補助金，厚生労働省科学研究費補助金，創薬等ヒューマンサイエンス総合研究事業，薬学研究奨励財団研究助成金，佐川がん研究助成振興財団研究助成，千里ライフサイエンス振興財団奨励研究助成の援助の下に行われたことを記して感謝申

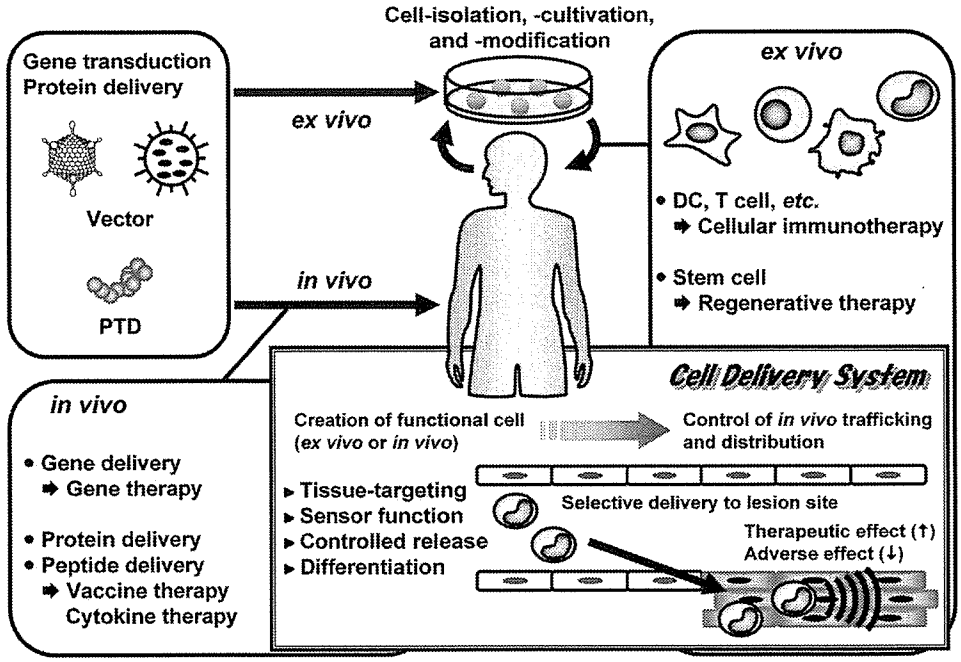


Fig. 11. Conceptual Illustration of Cell Delivery System in Next Generation Medical Treatment

し上げます.

REFERENCES

1) Esche C., Shurin M. R., Lotze M. T., *Curr. Opin. Mol. Ther.*, **1**, 72–81 (1999).
2) Kupiec-Weglinski J. W., Austyn J. M., Morris P. J., *J. Exp. Med.*, **167**, 632–645 (1988).
3) Lappin M. B., Weiss J. M., Delattre V., Mai B., Dittmar H., Maier C., Manke K., Grabbe S., Martin S., Simon J. C., *Immunology*, **98**, 181–188 (1999).
4) Martin-Fontecha A., Sebastiani S., Hopken U. E., Uguccioni M., Lipp M., Lanzavecchia A., Sallusto F., *J. Exp. Med.*, **198**, 615–621 (2003).
5) Yoshie O., Imai T., Nomiyama H., *Adv. Immunol.*, **78**, 57–110 (2001).
6) Zlotnik A., Yoshie O., *Immunity*, **12**, 121–127 (2000).
7) Bokoch G. M., *Blood*, **86**, 1649–1660 (1995).
8) Murphy P. M., *Annu. Rev. Immunol.*, **12**, 593–633 (1994).
9) Bergelson J. M., Cunningham J. A., Droguett G., Kurt-Jones E. A., Krithivas A., Hong J. S., Horwitz M. S., Crowell R. L., Finberg R. W., *Science*, **275**, 1320–1323 (1997).
10) Wickham T. J., Mathias P., Cheresh D. A., Nemerow G. R., *Cell*, **73**, 309–319 (1993).
11) Mizuguchi H., Kay M. A., *Hum. Gene Ther.*, **10**, 2013–2017 (1999).
12) 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).
13) Okada N., Masunaga Y., Okada Y., Iiyama S., Mori N., Tsuda T., Matsubara A., Mizuguchi H., Hayakawa T., Fujita T., Yamamoto A., *Cancer Gene Ther.*, **10**, 421–431 (2003).
14) Okada Y., Okada N., Nakagawa S., Mizuguchi H., Takahashi K., Mizuno N., Fujita T., Yamamoto A., Hayakawa T., Mayumi T., *Jpn. J. Cancer Res.*, **93**, 436–444 (2002).
15) Eerola A. K., Soini Y., Paakko P., *Clin. Cancer Res.*, **6**, 1875–1881 (2000).
16) Yin X. Y., Lu M. D., Lai Y. R., Liang L. J., Huang J. F., *Hepatogastroenterology*, **50**, 1281–1284 (2003).
17) Fukunaga A., Miyamoto M., Cho Y., Murakami S., Kawarada Y., Oshikiri T., Kato K., Kurokawa T., Suzuoki M., Nakakubo Y., Hiraoka K., Itoh T., Morikawa T., Okushiba S., Kondo S., Katoh H., *Pancreas*, **28**, e26–e31 (2004).
18) Naito Y., Saito K., Shiiba K., Ohuchi A.,

Saigenji K., Nagura H., Ohtani H., *Cancer Res.*, **58**, 3491–3494 (1998).

19) Shankaran V., Ikeda H., Bruce A. T., White J. M., Swanson P. E., Old L. J., Schreiber R. D., *Nature*, **410**, 1107–1111 (2001).

20) Zhang L., Conejo-Garcia J. R., Katsaros D., Gimotty P. A., Massobrio M., Regnani G., Makrigiannakis A., Gray H., Schlienger K., Liebman M. N., Rubin S. C., Coukos G., *N. Engl. J. Med.*, **348**, 203–213 (2003).

21) Paillard F., *Hum. Gene Ther.*, **10**, 695–696 (1999).

22) Dvorak H. F., *N. Engl. J. Med.*, **315**, 1650–1659 (1986).

23) Gao J.-Q., Tsuda Y., Katayama K., Nakayama T., Hatanaka Y., Tani Y., Mizuguchi H., Hayakawa T., Yoshie O., Tsutsumi Y., Mayumi T., Nakagawa S., *Cancer Res.*, **63**, 4420–4425 (2003).

24) Okada N., Gao J., Sasaki A., Niwa M., Okada Y., Nakayama T., Yoshie O., Mizuguchi H., Hayakawa T., Fujita T., Yamamoto A., Tsutsumi Y., Mayumi T., Nakagawa S., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **317**, 68–76 (2004).

25) Gao J.-Q., Alexandre L. S., Tsuda Y., Katayama K., Eto Y., Sekiguchi F., Mizuguchi H., Hayakawa T., Nakayama T., Yoshie O., Tsutsumi Y., Mayumi T., Nakagawa S., *Pharmazie*, **59**, 238–239 (2004).

26) Gao J.-Q., Sugita T., Kanagawa N., Iida K., Okada N., Mizuguchi H., Nakayama T., Hayakawa T., Yoshie O., Tsutsumi Y., Mayumi T., Nakagawa S., *Biol. Pharm. Bull.*, **28**, 1066–1070 (2005).

27) Okada N., Sasaki A., Niwa M., Okada Y., Hatanaka Y., Tani Y., Mizuguchi H., Nakagawa S., Fujita T., Yamamoto A., *Cancer Gene Ther.*, **13**, 393–405 (2006).

28) Banchereau J., Steinman R. M., *Nature*, **392**, 245–252 (1998).

29) Mellman I., Steinman R. M., *Cell*, **106**, 255–258 (2001).

30) Okada N., Saito T., Mori K., Masunaga Y., Fujii Y., Fujita J., Fujimoto K., Nakanishi T., Tanaka K., Nakagawa S., Mayumi T., Fujita T., Yamamoto A., *Biochim. Biophys. Acta*, **1527**, 97–101 (2001).

31) Okada N., Tsujino M., Hagiwara Y., Tada A., Tamura Y., Mori K., Saito T., Nakagawa S., Mayumi T., Fujita T., Yamamoto A., *Br. J. Cancer*, **84**, 1564–1570 (2001).

32) 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).

33) Okada N., Masunaga Y., Okada Y., Mizuguchi H., Iiyama S., Mori N., Sasaki A., Nakagawa S., Mayumi T., Hayakawa T., Fujita T., Yamamoto A., *Gene Ther.*, **10**, 1891–1902 (2003).

34) Okada N., Iiyama S., Okada Y., Mizuguchi H., Hayakawa T., Nakagawa S., Mayumi T., Fujita T., Yamamoto A., *Cancer Gene Ther.*, **12**, 72–83 (2005).

35) Kawamura K., Kadowaki N., Suzuki R., Udagawa S., Kasaoka S., Utoguchi N., Kitawaki T., Sugimoto N., Okada N., Maruyama K., Uchiyama T., *J. Immunother.*, **29**, 165–174 (2006).

36) Okada N., Mori N., Koretomo R., Okada Y., Nakayama T., Yoshie O., Mizuguchi H., Hayakawa T., Nakagawa S., Mayumi T., Fujita T., Yamamoto A., *Gene Ther.*, **12**, 129–139 (2005).

37) Gunn M. D., Kyuma S., Tam C., Kakiuchi T., Matsuzawa A., Williams L. T., Nakano H., *J. Exp. Med.*, **189**, 451–460 (1999).

38) Förster R., Schubel A., Breitfeld D., Kremmer E., Renner-Meller I., Wolf E., Lipp M., *Cell*, **99**, 23–33 (1999).

生産と技術　第58巻　第4号（2006）

次世代癌遺伝子治療戦略に適う改良型アデノウイルスベクター

研究ノート

金川尚子*，岡田直貴**，中川晋作***
大阪大学大学院薬学研究科薬剤学分野

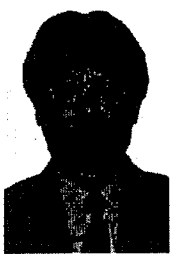
An improved adenoviral vector system for cancer immunogenetherapy

Key Words：Adenoviral vector, Cancer, Cytokine, Cell delivery system

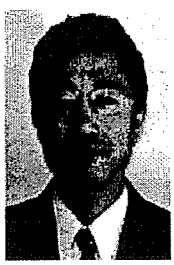
1．はじめに

ヒトゲノムプロジェクトが完了し，様々な難治性疾患の発症機構が遺伝子レベルで解き明かされる時代に突入した．これらの情報を疾病治療に応用しようとする遺伝子治療は，基礎研究と臨床研究との連携によって着実な進展を遂げており，21世紀の医療の一端を担うべき治療戦略として大いに期待されている．とりわけ癌を対象とした遺伝子治療は，患者数の多さと現在確立されている外科療法，化学療法，放射線療法を組み合わせた集学的療法だけでは十分な治癒が望めないという理由から，全遺伝子治療臨床研究プロトコールの70%近くを占めている．これまでの臨床研究によって癌遺伝子治療の実用化に向けての課題が抽出され，なかでも優れた遺伝子導入効率を発揮できるベクターシステムの確立が急務とされている．すなわち，既存の遺伝子治療用ベクターでは腫瘍組織への十分な遺伝子導入を達成できないことが治療効果を制限する大きな要因であるとの確かな知見が集積され，ここ数年の癌遺伝子治療研究においては，既存のベクターを応用した「治療」に観点を置いた研究に加えて，遺伝子導入効率を高めた「新規ベクターシステムの開発」を中心とした基盤研究も精力的に行われている．

*Naoko KANAGAWA
1982年2月生
2006年大阪大学大学院薬学研究科博士前期課程修了
現在，大阪大学大学院薬学研究科博士後期課程在学中
TEL　06-6879-8178
FAX　06-6879-8179
E-mail：kanagawa@phs.osaka-u.ac.jp



**Naoki OKADA
1970年2月生
1997年大阪大学大学院薬学研究科博士課程修了
現在，大阪大学大学院薬学研究科応用医療薬科学専攻薬剤学分野，講師，博士（薬学），生物薬剤学，細胞生物学，腫瘍免疫学，遺伝子治療学
TEL　06-6879-8178
FAX　06-6879-8179
E-mail：okada@phs.osaka-u.ac.jp



***Shinsaku NAKAGAWA
1959年12月生
1984年神戸学院大学大学院薬学研究科修了
現在，大阪大学大学院薬学研究科応用医療薬科学専攻薬剤学分野，教授，博士（薬学），薬剤学，遺伝子治療学
TEL　06-6879-8175
FAX　06-6879-8179
E-mail：nakagawa@phs.osaka-u.ac.jp

2．アデノウイルスベクター

アデノウイルス（Ad）ベクターは，252個のカプソメアからなる正20面体構造をしており，そのうち頂点にある12個は突起構造を持ったペントンと呼ばれ，他の240個はヘキソンと呼ばれる．ペントンは，ペントンベースとファイバーからなり，ファ

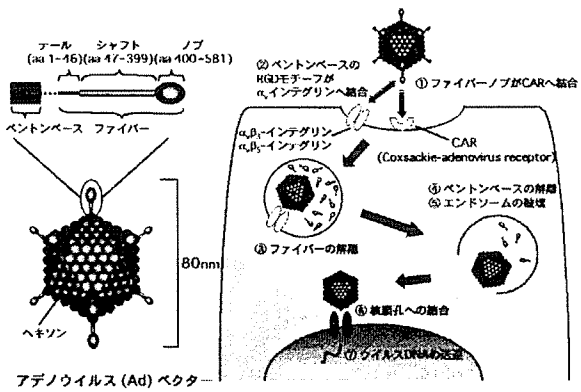


図1　アデノウイルスベクターの構造と遺伝子導入機序

イバーはさらに，テール，シャフト，ノブに分けられる（図1）．Adベクターの標的細胞内への侵入は，ファイバーノブがCoxsackie-adenovirus receptor（CAR）に結合し，続いてペントンベースのRGD（Arg-Gly-Asp）モチーフが細胞表面上のαv-integrinsに結合するという二段階の過程を経て，エンドサイトーシスにより起こる．エンドソームに達したAdベクターは，酸性条件下でカプシド蛋白質が構造変化を起こし，エンドソームを破壊して細胞質内へと移行する．その後，Adベクターは微小管に沿った逆行性輸送により核近傍まで運ばれ，核膜孔複合体に結合し，目的遺伝子の組み込まれたゲノムを核内へと送達することにより遺伝子発現を達成する（図1）．この機序に基づいて，Adベクターは種を問わず非分裂細胞を含めた広範な種類の細胞・組織に最も効率良く遺伝子導入可能であることから，遺伝子治療研究のみならず基礎研究の分野においても広く用いられているベクターである．しかし，腫瘍においては悪性度の進行に伴ってAdレセプターであるCARの発現レベルが低下することが知られており，有効な遺伝子治療を達成するためには副作用が危惧される高用量のAdベクター投与を余儀なくされる．

3．RGDファイバーミュータントアデノウイルスベクター

このような背景を踏まえて，我々はCAR低発現の腫瘍にも極めて効率よく遺伝子導入可能な新規ベクターの探索・改良を推進し，遺伝子工学的手法を駆使することによってAdベクターの感染スペクトラムを大幅に拡大したRGDファイバーミュータントAd（AdRGD）ベクターの開発に成功した．図2に示すように，ファイバーノブにαv-integrins親和性のRGDペプチド配列を表現させたAdRGDベクターは，従来型Adベクターと比較して，CAR低発現のマウス線維芽肉腫Meth-A細胞に対するルシフェラーゼ遺伝子（レポーター遺伝子）の導入・発現効率を飛躍的に改善することができた[1]．さらに，抗腫瘍活性を示す代表的なサイトカインであるTNF-αあるいはIL-12の遺伝子を搭載したベクターを，あらかじめマウスに生着させたCAR低発現腫瘍に10^8 vector particles/tumorの用量で投与したところ，従来型Adベクター投与群と比較してAdRGDベクター適用群では劇的な治療効果の改善が観察された（図3）[2)3)]．これらの結果は，AdRGDベクターが癌遺伝子治療の有効性向上と投与ベクター量の削減に伴う副作用回避を充たす有用な新規ベクターシステムであることを実証するものであり，遺伝子工学的手法によるAdベクターの感染域改変技術が，今後の癌遺伝子治療の推進・振興に大きく貢献できることを期待させる．

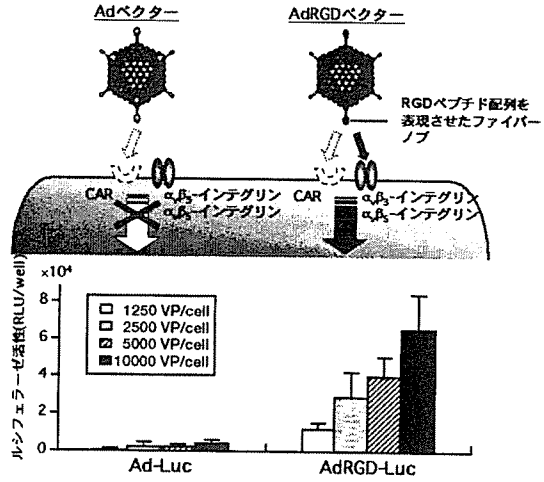


図2　従来型／改変型アデノウイルスベクターの遺伝子発現効率

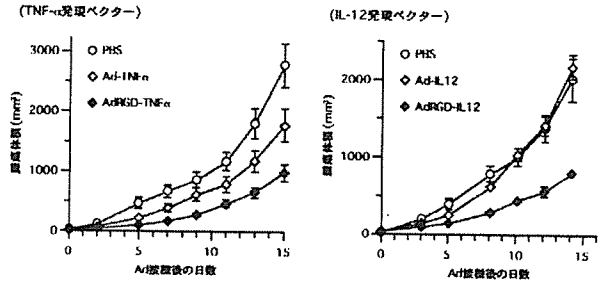


図3　アデノウイルスベクターの構造と遺伝子導入機序

4．新規癌免疫遺伝子治療の開発に向けた基盤研究

次世代癌治療戦略として有望視される免疫療法は，臨床試験において有効性は示唆されているもののいまだ確立された治療法とはなりえていない．この一因として，効果的な癌免疫療法を達成する上で必要な免疫エフェクター細胞の腫瘍組織への集積性改善という側面が十分に検討されていないことが挙げられる．つまり，種々のワクチン手法によってたとえ患者体内に癌細胞を殺傷できる免疫エフェクター細胞が誘導されたとしても，それらが十分に腫瘍

組織に移行・浸潤して癌細胞と接触できなければ，癌免疫療法の有効性は大きく制限されてしまう．

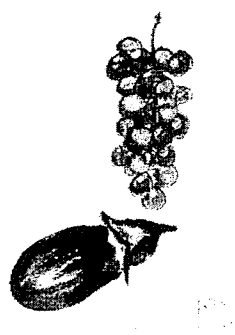
ケモカインと総称される分泌タンパク群は，特異的なケモカインレセプターを介した刺激によって白血球の局所への遊走・浸潤を誘発することが知られており，種々の細胞接着分子と協調して炎症反応やリンパ球のホーミングを制御している．そこで我々は，ケモカイン-ケモカインレセプター連関を応用することによって，腫瘍免疫の中心的なエフェクター細胞であるT細胞，NK細胞の腫瘍集積性を増強させる方法論を確立すれば，癌免疫療法の有効性改善，延いては臨床応用の実現に向けて非常に有用であろうと考えた．

このコンセプトに基づいて，各種ケモカイン遺伝子を搭載したAdRGDベクターを構築し，これらを腫瘍内投与した際の浸潤リンパ球の頻度・サブセットと抗腫瘍効果との連関を解析したところ，CCL17, CCL19, CCL22, CCL27と呼ばれる4種のケモカインを発現させた腫瘍においては，T細胞ならびにNK細胞の顕著な浸潤増加に伴う明らかな腫瘍増殖抑制効果が観察された[4)-6)]．本研究成果は，AdRGDベクターを応用したケモカイン遺伝子導入技術が，生体内の免疫細胞の分布・局在の緻密な制御，すなわち「必要なときに，必要な部位へ，必要な数の」細胞を送達する“Cell Delivery System”ともいうべき新たな概念・方法論の確立，に大きく貢献できることを示唆している．

5．おわりに

我々は，今回紹介したAdRGDベクターのみならず，腫瘍組織特異的に治療用遺伝子を発現することができるAdベクター，全身投与において腫瘍組織に選択的に集積するAdベクター，など癌遺伝子治療の最適化を充たす新規ベクターシステムの開発を進めている．これら改良型Adベクターの設計・創製には，遺伝子導入効率の増強に基づく有効性の改善はもちろんのこと，遺伝子導入の組織特異性の制御やベクター自身の抗原性を低減することによる副作用回避をも考慮に入れる必要がある．また現在の次世代ベクターシステムの開発研究においては，遺伝子導入効率に優れるという観点から専らAdベクターをはじめとするウイルスベクターの改良に力が注がれているが，これらの研究から得られるウイルスの細胞内動態および遺伝子核内送達機序に関する知見・情報を非ウイルスベクターに導入することができれば，将来的には優れた遺伝子導入効率と高い安全性を兼ね備えた新規ベクターシステムの開発に結びつく可能性が期待される．

遺伝子を薬物と見なした遺伝子治療では，ベクターは剤形であり，薬物の作用を最大限に発揮できる剤形を設計するのが薬学の使命であり，我々が果たすべき役割は大きい．

6．参考文献

1）Gao JQ et al. Biochem. Biophys. Res. Commun. 328：1043-1050（2005）
2）Okada Y et al. Cancer Lett. 177：57-63 (2002)
3）Okada Y et al. Biochim. Biophys. Acta 1670：172-180（2004）
4）Gao JQ et.al. Cancer Res. 63：4420-4425 (2003)
5）Okada N et al. Biochem Biophys Res Commun. 317：68-76（2004）
6）Gao JQ et al. Biol. Pharm. Bull. 28：1066-1070 (2005)