

ウイルス機能を基盤とする DDS キャリアーの開発と応用

吉川友章，岡田直貴，中川晋作

近年、遺伝子やタンパク質を医薬品として投与することにより、癌やウイルス感染症といった難治性疾患を治療しようとする先端医療が注目されている。これらの治療法を、副作用が少なく、有効性の高い理想的な治療法として確立するためには、遺伝子やタンパク質を「必要な時に、必要な部位へ、必要な量だけ送達する」ための革新的 DDS 技術の開発が必須である。本稿では、われわれが開発するウイルスの細胞内侵入機構を巧みに利用した遺伝子・タンパク質用 DDS キャリアー（ベクター）の創出と疾病治療への応用について紹介する。

はじめに

ヒトゲノム解読が完了したことにより、ゲノム情報に立脚した遺伝子治療、タンパク質療法、細胞療法が難治性疾患に対する次世代治療戦略として注目されている。一般に、遺伝子やタンパク質は体内安定性に乏しく、効果発現には特定の組織・細胞・オルガネラへの送達が必要であることから、これら先端医療を高い有効性と安全性を兼ね備えた治療法として確立するためには、より高機能化された DDS 技術の開発が不可欠である。本観点から、最近の遺伝子・タンパク質療法の最適化を目的とした DDS 開発研究のトピックとして、ウイルスの細胞内侵入能を巧みに利用したキャリアー・ベクターシステムの開発が注目されている。

ウイルスは宿主細胞内に侵入して、自身のゲノム（遺伝子）を核内に送り込むことで増殖を繰り返す病原体であり、ウイルスの種類によって細胞内への侵入機構やその増殖様式はさまざまである。われわれは、これらウイルスの生活環を上手く活用し、さらにその機能を人工的に改変することによって、それぞれの治療目的に見合った新規 DDS 基盤技術の開発を推進している。本稿では、われわれが開発した膜融合リポソームおよび改良型アデノウイルスベクターの DDS キャリアー・ベクター特性とそれらの疾病

治療への応用について紹介する。

1. 膜融合リポソーム

センダイウイルス（HVJ）は、エンベロープを構成する HN/F タンパク質と細胞膜との融合によって感染するウイルスである¹⁾。われわれは、HVJ が細胞膜のみならず脂質を主成分とするリポソームとも融合できることに着目し、紫外線照射によって不活化した HVJ とリポソームとを融合させた膜融合リポソーム（fusogenic liposome：FL）の開発に成功した（図 1-A）²⁾³⁾。この FL は、表面に存在する HVJ 由来のエンベロープタンパク質を介した膜融合によって、リポソーム内に封入できる物質であれば細胞質内に直接導入することが可能である（図 1-B）。われわれは、遺伝子やタンパク質・ペプチドからナノサイズの粒子（nanoparticle：NP）まで、さまざまな物質を内包した FL の調製に成功しており（図 2-A）、FL が遺伝子治療用ベクターあるいはワクチン療法における抗原送達キャリアーとしてきわめて有用であることを報告している^{3)~5)}。本稿では誌面の都合上、NP 封入 FL を利用した細胞質内薬物動態制御システムの開発に焦点を絞って概説する。

従来の DDS 研究においては、薬物の生体内動態を最適化することによって薬効増大と副作用

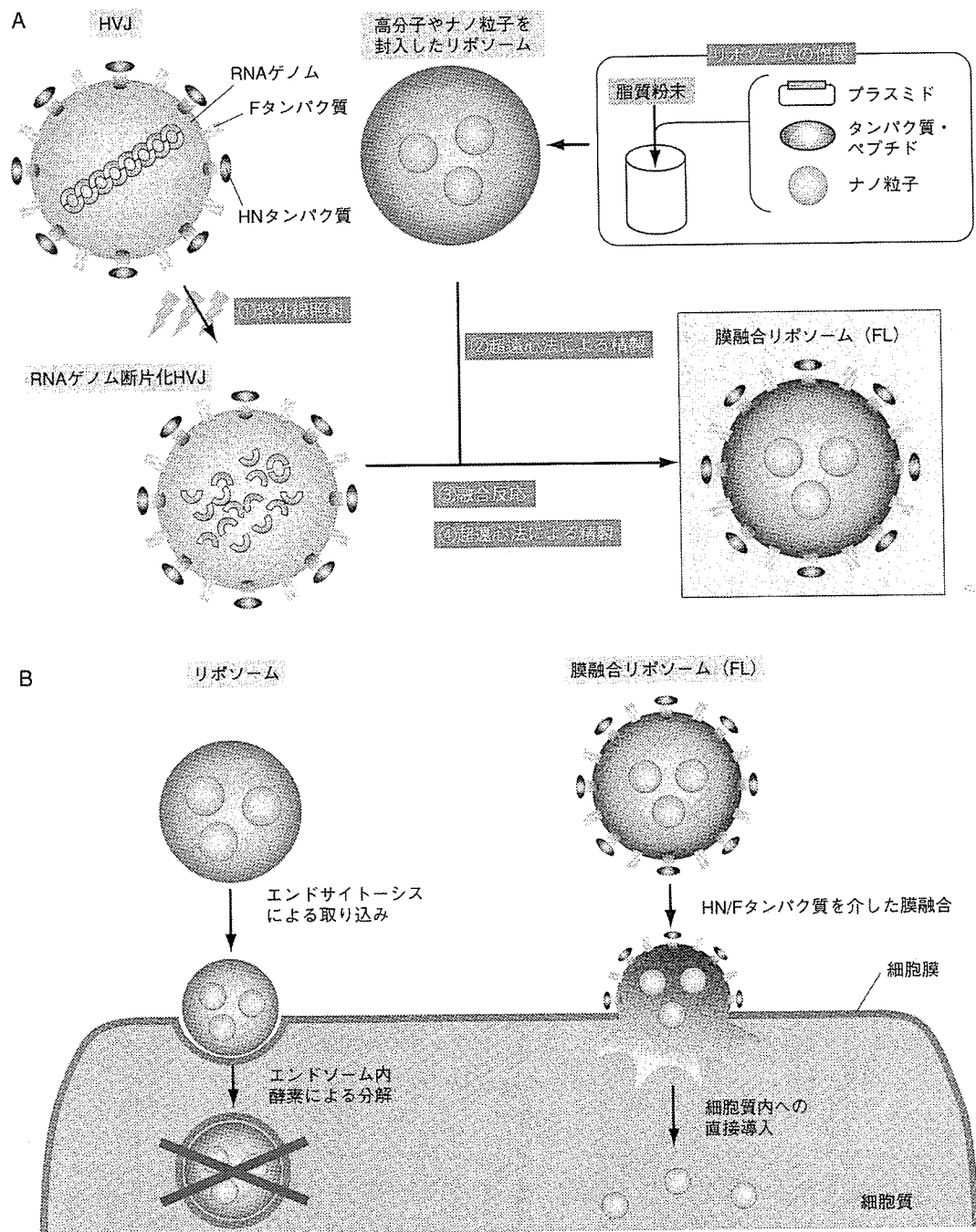


図1 ●膜融合リボソーム (FL) の作製法 (A) と細胞質内物質導入機序 (B)

A) ①HVJに紫外線を照射してRNAゲノムを断片化(不活化)する。②遺伝子、タンパク質、ペプチドなどの高分子やナノ粒子を封入したリボソームを作製し、超遠心法により精製する。③不活化HVJとリボソームを37℃でインキュベーションして融合させる。④ショ糖密度勾配超遠心法によって融合反応液から未反応のHVJおよびリボソームを除き精製FLを得る。B) 通常のリボソームはエンドサイトーシスによって細胞内に取り込まれるために、内封物質がエンドソーム内酵素によって分解され、細胞質内へ送達される量は大きく制限される。一方、FLはHVJ由来のHN/Fタンパク質の活性によって細胞膜と融合するため、内封物質を細胞質内に直接送達することができる。また、FLの膜融合活性は血清存在下でも低下しないため、FLを用いた細胞質内物質送達法は*in vivo*にも適用が可能である

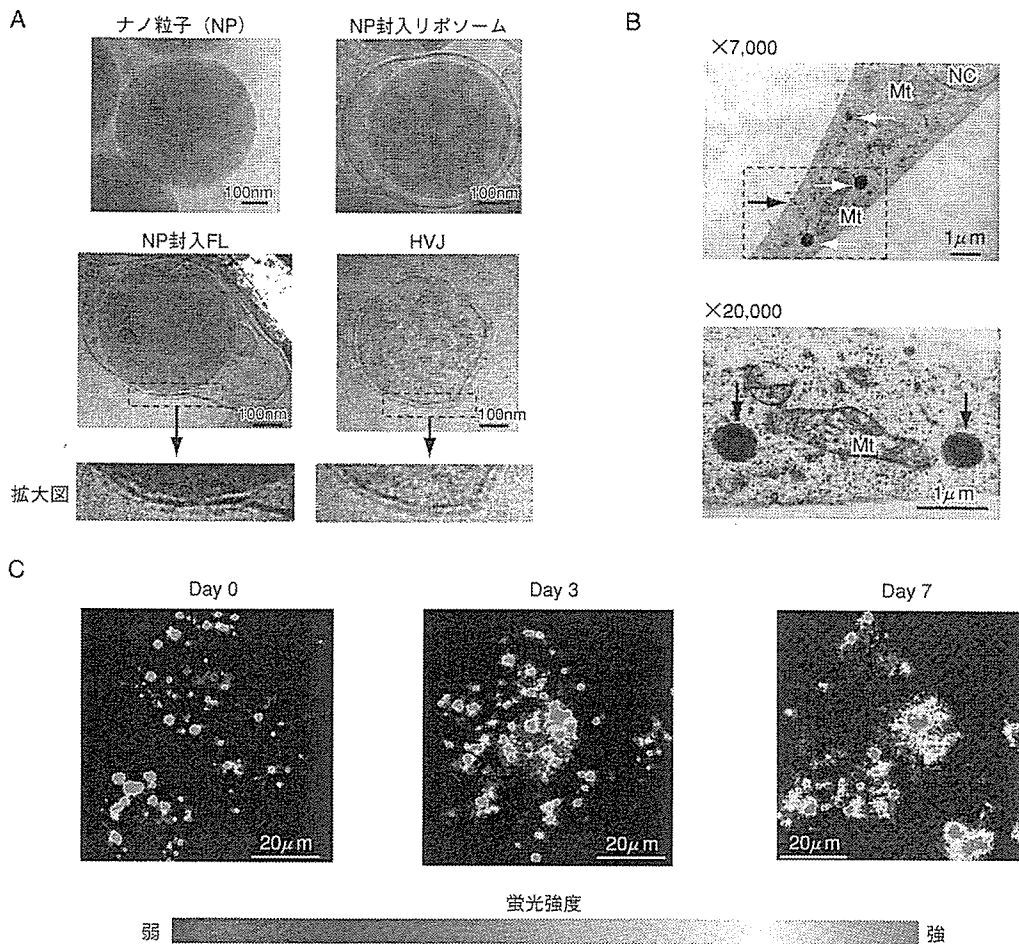


図2 ●ナノ粒子 (NP) 封入 FL の作製と細胞質内薬物徐放システムへの応用

A) 直径 500nm の NP を 1 個封入したリボソームと HVJ を融合させると、内部に 1 個の NP を封入した FL を調製することができる。また、FL の膜表面を拡大すると、HVJ の表面と同様な外殻タンパク質のスパイク構造を観察することができる (スケールバー: 100nm)。B) NP 封入 FL を作用させたサル腎上皮細胞株を透過型電子顕微鏡により観察した。細胞質内に導入された NP (矢印) がミトコンドリア (Mt) や核 (NC) とは異なる部位に存在していることがわかる。C) FL を用いて蛍光標識オリゴ DNA (ODN) を吸着させた NP を細胞に導入し、蛍光強度の経日変化を画像解析した。導入直後 (Day 0) では細胞質内に高濃度 (赤色) の ODN がスポット状に局在する像が観察された。この細胞を 3 日間培養すると、ODN が NP 表面から解離したことを示す弱い蛍光 (青色) が細胞質に現れ、7 日後においてはほとんどの細胞において ODN の細胞質全体にわたる拡散を確認できた。

低減を図るアプローチが中心であったが、有効かつ安全な遺伝子治療およびタンパク質療法の確立に向けては、薬物となる遺伝子・タンパク質の生体内動態に加えて細胞内動態の時空間的制御が望まれる。本観点からわれわれは、遺伝子やタンパク質を吸着させた NP を FL によって細胞質内に導入し、細胞内でこれら生理活性物質を徐放させるシステムの構築を試みた。NP 内

包 FL を作用させた培養細胞を電子顕微鏡により観察したところ、NP が確かに細胞質内に送達されている像が認められ (図 2-B)、さらに FL を用いて蛍光標識オリゴ DNA (ODN) を吸着させた NP を導入した細胞において、細胞質中で NP から ODN が経時的に放出されることも明らかとした (図 2-C)²⁾。われわれのこれらの成果は、FL を応用した細胞質内 NP デリバリーが細胞質

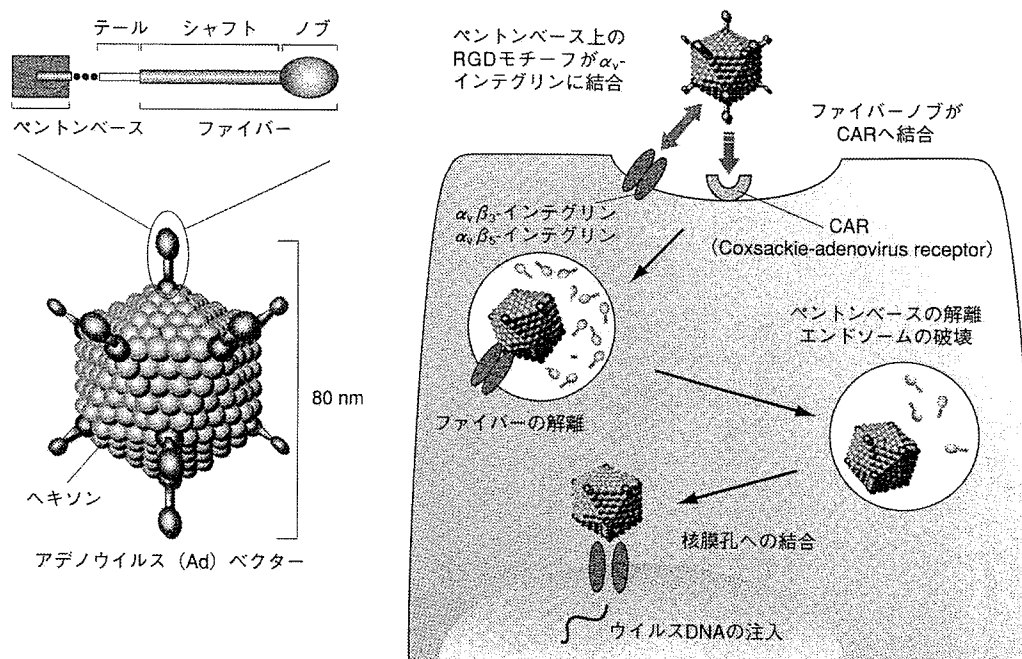


図3 ● Ad ベクターの構造と細胞内への侵入様式

直径約80nmの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個は突起構造をも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、ファイバーはさらに、テール、シャフト、ノブに分けられる。Adベクターの標的細胞内への侵入は、ファイバーノブが感染受容体であるCARに結合し、続いてペントンベースのRGDモチーフが細胞表面上の α_v -インテグリンに結合するという2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タンパク質の構造変化を起こし、エンドソームを破壊して細胞質内へと移行する。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て目的遺伝子の組み込まれたゲノムを核内へと送達する

内薬物徐放システムとして有用であることを示すとともに、今後、徐放させる生理活性物質の細胞内分布制御（オルガネラターゲティング）をも可能とするアプローチと組み合わせることで、FLが遺伝子治療やタンパク質療法の最適化を充たす重要な基盤技術となりうることを示唆している。

2. 改良型アデノウイルスベクター

アデノウイルス（Ad）は、臨床的には小児期に急性気道炎、角結膜炎、膀胱炎などを起こすウイルスであり、ヒトでは少なくとも51種類の血清型が知られている⁶⁾。現在、遺伝子治療研究および基礎研究に広く用いられているAdベクターは2型あるいは5型Adを基盤として開発され

ており、その遺伝子導入機構はAdの感染機構をそのまま利用している（図3）。この機序に基づいて、Adベクターは広範な種類の細胞・組織に分裂期・静止期を問わず効率良く遺伝子導入できる。しかし、悪性腫瘍細胞および血球系細胞のように感染受容体（CAR）の発現が乏しいあるいは欠損している細胞種では、遺伝子治療の重要なターゲットでありながらAdベクターを用いてさえ十分な遺伝子発現が得られない。この問題を克服するためにわれわれは、ファイバー先端部にRGD（Arg-Gly-Asp）ペプチドを提示させることによって α_v -インテグリン指向性を付与した改良型Ad（AdRGD）ベクターを開発し、従来型Adベクターでは遺伝子導入が困難であった細胞にもきわめて効率良く遺伝子発現させるこ

伝子導入による免疫細胞の体内動態制御法の構築¹¹⁾¹²⁾を進めており、従来のベクターシステムでは達成し得なかった新規 DDS 戦略の先端医療への導入を図っている。なかでも上記③の研究では、生体内における白血球の局所への遊走・浸潤の制御において中心的な役割を担うケモカイン-ケモカイン受容体連関に着目し、細胞免疫療法において「くすり」として患者に投与する樹状細胞やT細胞などの細胞医薬、あるいはその細胞医薬に応答する免疫細胞の体内動態を自由自在にコントロールできる方法論の確立をめざしており、これは「必要なときに、必要な部位へ、必要な量の」細胞を送達する“Cell Delivery System”ともいうべき革新的なコンセプトである¹³⁾。今後、AdRGD ベクターのみならず、種々の細胞医薬創製に最適な新規ベクターシステムの開発が進展すれば、この Cell Delivery System は幹細胞を用いた再生医療などの有効性・安全性の向上にもおおいに貢献し得る DDS 戦略であると期待している。

おわりに

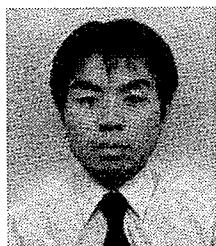
人類の歴史はウイルスをはじめとする感染症との戦いの歴史であったといっても過言ではなく、近代のウイルス研究の本義はウイルスによって引き起こされる疾病を診断し、予防、治療する方法を開発することにある。一方で、近年の分子生物学の飛躍的な進展はウイルス研究なくしてはありえず、ウイルス研究によって逆転

写酵素、スプライシング機構などのきわめて重要な発見がなされるとともに、われわれ人類はウイルス研究を通じて純粋に生命現象の神秘・不思議さに感動し、ウイルスを単に疾病の原因物質として退治するだけでなく、積極的に人類のために利用しようとして試みてきた。

近年の生命科学の目覚ましい発展は「くすり」の概念に大きな変革をもたらし、従来の低分子有機化合物のみならず遺伝子やタンパク質、さらには生命体を構成する細胞をも医薬品素材として捉えることが可能となってきた。本稿で紹介したようにわれわれは、これら生物医薬品を用いた次世代治療法の最適化に「ウイルス機能を利用した DDS 的発想・研究戦略」が大きく貢献できるものと確信しており、今後の DDS 研究はより一層ウイルス研究・ウイルス学との融合が図られていくものと思われる。

参考文献

- 1) Okada, Y.: *Curr. Top. Membr. Transp.* 32 : 297-336, 1988
- 2) Mizuguchi, H. et al.: *Br. J. Cancer*, 73 : 472-476, 1996
- 3) Mizuguchi, H. et al.: *Cancer Res.*, 58 : 5725-5730, 1998
- 4) Kunisawa, J. et al.: *J. Immunol.*, 167 : 1406-1412, 2001
- 5) Kunisawa, J. et al.: *J. Control Release*, 105 : 344-353, 2005
- 6) Shenk, T.: *Adenoviridae*. In "Fields Virology Vol. 2" (Eds.) Fields, B. N. et al.: pp.2111-2148 : Lippincott-Raven Publishing, Philadelphia, PA., 1996
- 7) Okada, N. et al.: *Cancer Res.*, 61 : 7913-7919, 2001
- 8) Okada, Y. et al.: *Cancer Lett.*, 177 : 57-63, 2002
- 9) Okada, Y. et al.: *Gene Ther.*, 10 : 700-705, 2003
- 10) Okada, Y. et al.: *Cancer Gene Ther.*, 12 : 608-616, 2005
- 11) Okada, N. et al.: *Gene Ther.*, 12 : 129-139, 2005
- 12) Gao, J. Q. et al.: *Cancer Res.*, 63 : 4420-4425, 2003
- 13) Okada, N.: *Biol. Pharm. Bull.*, 28 : 1543-1550, 2005



吉川友章 (Tomoaki Yoshikawa)

大阪大学大学院薬学研究科特任研究員。

1977年生まれ。2001年、神戸大学農学部生物機能化学科卒。2006年、大阪大学大学院薬学研究科博士課程修了(薬学博士)。同年4月より現職。

受賞：2005年、ファーマバイオフォーラム2005最優秀発表賞(日本薬学会生物系薬学部)。2006年、日本薬剤学会第31回製剤セミナー Postdoctoral Presentation Award。

特集I 抗腫瘍免疫療法の新戦略

ケモカイン・ケモカイン レセプター連関を利用した 抗腫瘍免疫の増強*

杉田 敏 樹**
岡田 直 貴**
中川 晋 作**

Key Words : chemokine, chemokine receptor, Cell Delivery System

抗腫瘍免疫療法における ケモカイン・ケモカインレセプターの役割

近年の分子生物学の目覚ましい発展に伴い、ケモカインと総称される細胞遊走を司る分子群が次々と同定され、リンパ球の血中から組織への浸潤メカニズムが徐々に明らかとなりつつある。リンパ球は通常、血管内皮細胞への接着と解離を繰り返しながら血液中を流れており、この状態では組織内へは浸潤しない。しかし、リンパ球浸潤が起こっている炎症組織やホーミング先の組織では、特定のケモカインが高発現しており、その血管内皮細胞上には特定のケモカインが提示されている。ケモカイン存在下では、ローリングしたリンパ球上のインテグリンが活性化し、これを介して血管内皮細胞上の接着分子に強固に接着する。そして、ケモカインレセプターを発現しているリンパ球が、ケモカインの濃度依存的に血管内皮細胞間隙を通り組織内へと浸潤する。このようにケモカインは、図1で示したリンパ球浸潤の②~④の過程に必須の分子であり、ケモカイン・ケモカインレセプター連関はリンパ球浸潤の要を担っている^{1)~3)}。

抗腫瘍免疫療法では、抗腫瘍エフェクター細

胞が腫瘍内へと浸潤することによって、初めて抗腫瘍作用が得られる。しかし、一般的に腫瘍内はリンパ球が浸潤しにくい環境にあるため、抗腫瘍エフェクター細胞の多くが腫瘍内へと遊走できず、抗腫瘍活性を示すことが困難である。また、樹状細胞(DC)ワクチン療法や養子免疫療法は、自己の免疫細胞を細胞医薬として捉え、それらを生体内に投与することにより治療を目指す手法である。しかし、投与細胞がリンパ節や腫瘍といった標的組織への移行活性をほとんど有していないために、医薬品としての活性を十分に発揮することができていない。そこで、ケモカイン・ケモカインレセプター連関を利用することにより、これら抗腫瘍エフェクター細胞の生体内動態を制御できれば、治療効果が増強するものと期待できる。そこで本稿では、ケモカイン・ケモカインレセプター連関を利用した抗腫瘍免疫療法について、われわれの取り組みを含めて、その現状と今後の展開について紹介する。

ケモカインによる抗腫瘍エフェクター細胞 の腫瘍内集積性向上と抗腫瘍活性の増強

サイトカインやワクチンなどにより活性化した抗腫瘍エフェクター細胞は、腫瘍内へ浸潤することにより、直接的に腫瘍細胞を傷害し治療効果を示す。しかし、前述したように一般的に

* The enhancement of the antitumor immunity using the chemokine and chemokine receptor linkage.

** Toshiki SUGITA, Naoki OKADA, Ph.D. & Shinsaku NAKAGAWA, Ph.D.: 大阪大学大学院薬学研究所薬剤学分野 [〒565-0871 吹田市山田丘1-6]; Department of Biopharmaceutics, Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Osaka University, Suita 565-0871, JAPAN

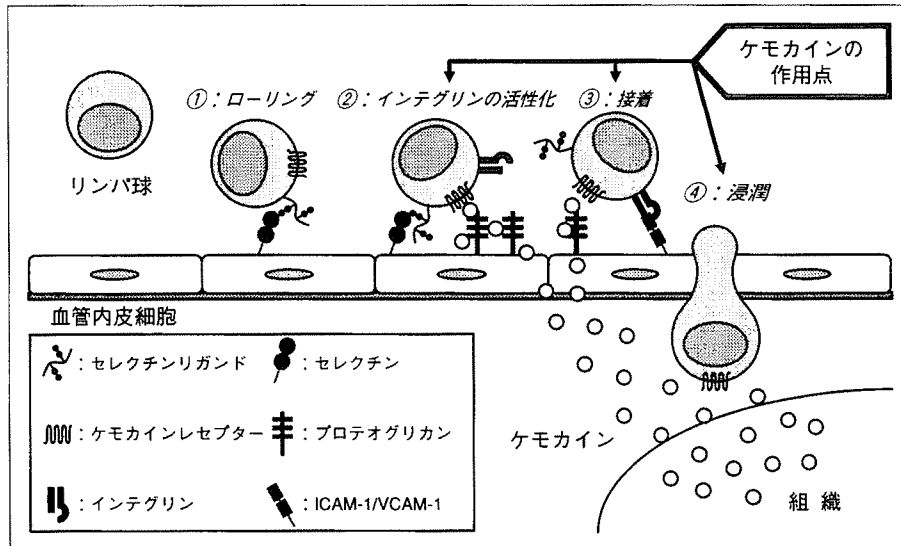


図1 リンパ球の組織浸潤とケモカインの役割

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留まる(①:ローリング)。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通じ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:インテグリンの活性化)。次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それぞれ血管内皮細胞上のICAM-1やVCAM-1などの接着分子に強固に接着し(③:接着)、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:浸潤)する。

腫瘍内は抗腫瘍エフェクター細胞群が浸潤しにくい環境になっているために、治療効果を発揮することができずにいる。そこで、腫瘍内でケモカインを高発現させ、その細胞遊走活性を利用すれば、抗腫瘍エフェクター細胞の腫瘍内への低浸潤性を改善できるものと予想できる。このような背景のもと、これまでに種々のケモカインについて、抗腫瘍免疫療法の研究がなされている。表1は、その一部をまとめたものであるが^{14)~20)}、これらケモカインの抗腫瘍効果の検討方法は*ex vivo*法と*in vivo*法の2種類に大別できる。*Ex vivo*法は、効果を示すケモカインをスクリーニングするのに適しており、*in vivo*法は、*ex vivo*法の結果により絞り込まれた候補となるケモカインについて、実際に治療効果を有するものを探索することができる。しかし、用いている腫瘍モデルやケモカインの投与方法が異なっているために、多様なケモカインの中から有効性に優れた治療システムを見出すことは困難である。そこでわれわれは、8種類のケモカインに

ついて体系的に治療効果を検討し、ケモカインを用いた抗腫瘍免疫療法の最適化を試みている¹³⁾。本稿では、そのうちCCL17とCCL19の結果について紹介する。

まず、各ケモカイン発現ベクターを腫瘍内に投与し、その抗腫瘍効果について検討したところ、CCL17、CCL19ともに、治療効果はほとんど認められなかった(図2A)。しかし、T細胞の腫瘍内浸潤数は、CCL17群ではコントロール群と変わらなかったが、CCL19群では多くのT細胞が腫瘍内へと浸潤しており(図2B)、治療効果とは相関しなかった。表1に示した中には、ケモカイン単独による投与でも抗腫瘍効果を示すものもあるが、われわれの結果は、ケモカインにより腫瘍内に免疫細胞を浸潤させるだけでは必ずしも治療効果が得られないというものである。そこでわれわれは、まず腫瘍関連抗原(gp100)を導入したDCで免疫することにより抗腫瘍免疫応答を誘導した上で、先ほどと同様の検討を行った(図2C)。抗原導入DCの免疫により、腫瘍特異

表 1 ケモカインを用いた抗腫瘍免疫療法

検討方法	ケモカイン	ケモカイン投与方法	マウス腫瘍モデル	Ref.
<i>Ex vivo</i>	CXCL11 (I-TAC)		EL4	4)
	CCL3 (MIP-1 α)		B16F10	5)
	CCL5 (RANTES)		EL4	6)
	CCL17 (TARC)		B16BL6, OV-HM, CT26	8)
	CCL19 (ELC/MIP-3 β)		B16BL6, OV-HM, CT26	8) 9)
	CCL20 (LARC/MIP-3 α)		B16BL6, OV-HM, CT26	8)
	CCL21 (SLC/6Ckine)		B16BL6, OV-HM, CT26	8)
	CCL22 (MDC)		B16BL6, OV-HM, CT26	8)
	CCL17 (ILC/CTACK)		B16BL6, OV-HM, CT26	7) 8)
	XCL1 (lymphotactine)		B16BL6, OV-HM, CT26	8) 9)
	CX3CL1 (fractalkine)		B16BL6, OV-HM, CT26, EL4	7) 8) 10)
	CXCL10 (IP-10)	plasmid DNA	B16F10	11)
	CCL4 (MIP-1 β)	Adenovirus vector	CT26	12)
<i>In vivo</i>	CCL17 (TARC)	Adenovirus vector	B16BL6	13)
	CCL19 (ELC/MIP-3 β)	Adenovirus vector	B16BL6	13)
		Recombinant protein	L1CZ	14)
	CCL20 (LARC/MIP-3 α)	Adenovirus vector	CT26, CL25, CT26, B16BL6, LLC	13) 15)
	CCL21 (SLC/6Ckine)	Adenovirus vector	B16BL6	13)
		Recombinant protein	LLC, B16BL6	16) 17)
		Vaccinia virus vector	CT26-CEA	18)
	CCL22 (MDC)	Adenovirus vector	B16BL6, 3LL	13) 19)
	CCL27 (ILC/CTACK)	Adenovirus vector	B16BL6	13)
	XCL1 (lymphotactine)	Adenovirus vector	B16BL6, SP2/0	13) 20)
CX3CL1 (fractalkine)	Adenovirus vector	B16BL6	13)	

*Ex vivo*法では、ケモカイン発現腫瘍細胞株を皮内接種し、その抗腫瘍効果を検討している。*In vivo*法では、表に示した手法によりケモカインを腫瘍内に投与し、その抗腫瘍効果を検討している。

的な細胞傷害性 T 細胞を誘導可能であることは確認しているが、単に抗腫瘍免疫応答を誘導しただけでは、治療効果がほとんど得られなかった。しかし、抗腫瘍免疫応答を誘導したマウスの腫瘍内に CCL17 を発現させることによって、飛躍的に抗腫瘍効果が増強することが明らかとなった。そこで、腫瘍内の T 細胞数について調べてみたところ、CCL19 群よりも CCL17 群の方が、より多くの T 細胞が浸潤しており、治療効果と相関した結果が得られた(図2D)。さらに、腫瘍内の活性化因子の発現について調べたところ、著効を示した CCL17 群では、細胞傷害性因子や炎症性サイトカインの高い発現が確認された(図2E)。すなわち、抗原導入 DC で免疫することにより活性化した抗腫瘍エフェクター細胞が、ケモカインによって腫瘍内へと浸潤し、治療効果を示したものと考えられる。すなわち、ケモカインによる遊走活性を利用することで、生体内に存在する免疫細胞の動態制御が可能となり、それにより抗腫瘍効果が増強できることが示唆

された。

ケモカインの有する免疫細胞浸潤活性は、ワクチン療法やサイトカイン療法といった免疫系を活性化する方法に応用可能である。われわれは、IL-12 と CCL27 を腫瘍内に共発現させることにより、免疫系の活性化と腫瘍内への浸潤の両者を同時に達成し、治療効果を増強できることを確認しており(現在投稿中)、ケモカインを用いた抗腫瘍免疫療法の発展が期待される。

ケモカインレセプターによる DC のリンパ節送達と抗腫瘍免疫応答増強

抗腫瘍免疫応答は、まず DC をはじめとする抗原提示細胞が腫瘍抗原を取り込み、抗原感作の場であるリンパ節へと移行することからはじまる。そして、リンパ節内で抗腫瘍エフェクター細胞を活性化することにより、抗腫瘍効果を示す。DC ワクチン療法はこの機構を利用した治療法であり、人為的に腫瘍抗原を導入した DC を生体内に投与することで、抗腫瘍免疫応答を惹起

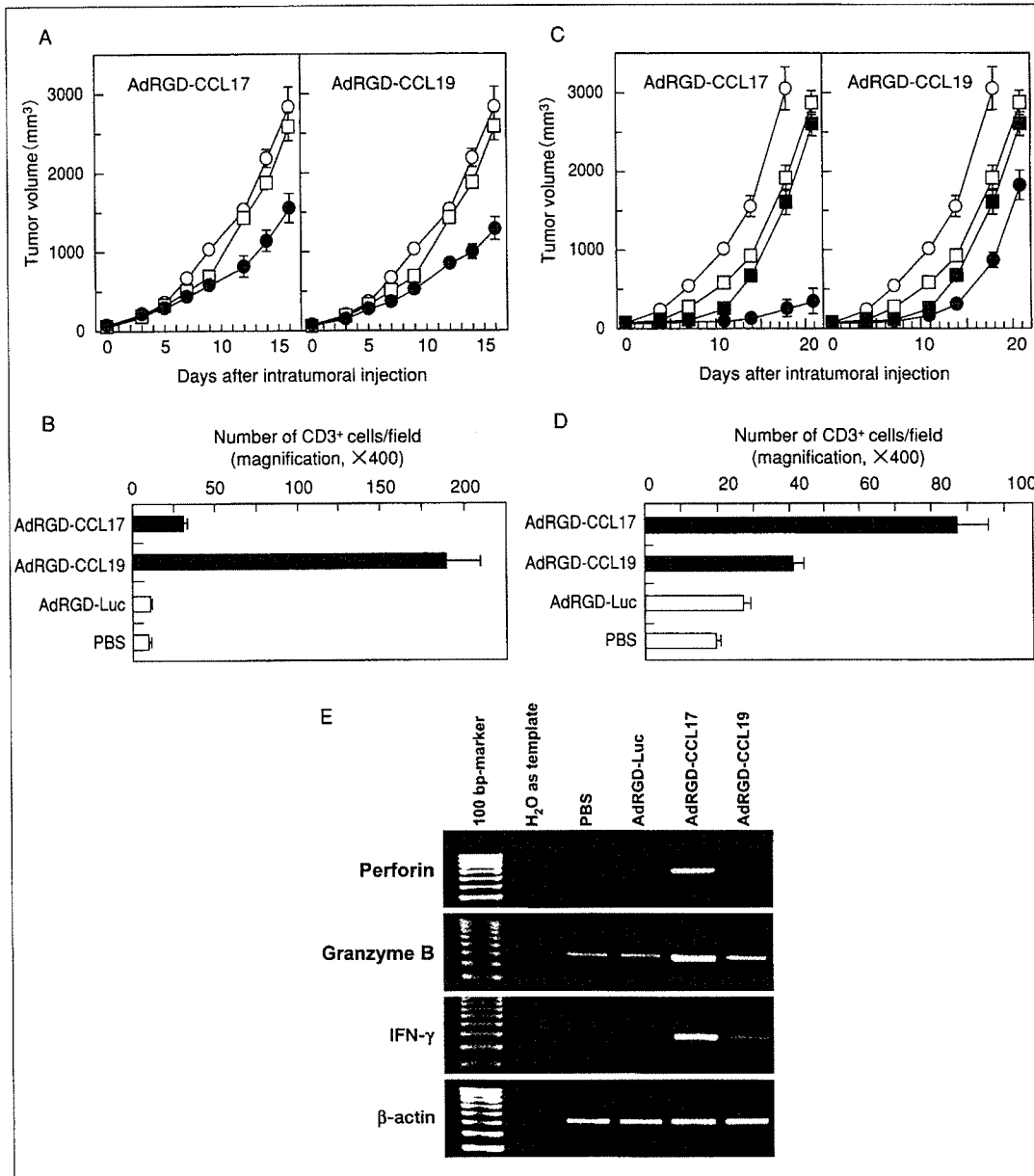


図2 ケモカイン遺伝子導入による抗腫瘍効果

A, B : B16BL6腫瘍移植マウスに各ケモカイン発現AdRGD(●), luciferase発現AdRGD(□), PBS(○)を腫瘍内投与した。その後、経日的に腫瘍体積を測定するとともに(A), 投与2日後に腫瘍を回収し、浸潤T細胞数を免疫染色法により測定した(B)。

C~E : B16BL6腫瘍移植マウスに、メラノーマ関連抗原(gp100)を導入したDC(●, ■, □), PBS(○)を免疫した。その後、各ケモカイン発現AdRGD(●), luciferase発現AdRGD(■), PBS(□, ○)を腫瘍内投与し、経日的に腫瘍体積を測定した(C)。また、投与2日後に腫瘍を回収し、浸潤T細胞数を免疫染色法により測定するとともに(D), total RNAを回収し、各mRNA発現をRT-PCRにより確認した(E)。

しようとするものである。しかし現在のDCワクチン療法では、投与した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%程度で

あり、この移行率の低さが、十分な治療効果につながらない要因の一つとしてあげられている。生体内のDCが末梢組織からリンパ節へと遊走す

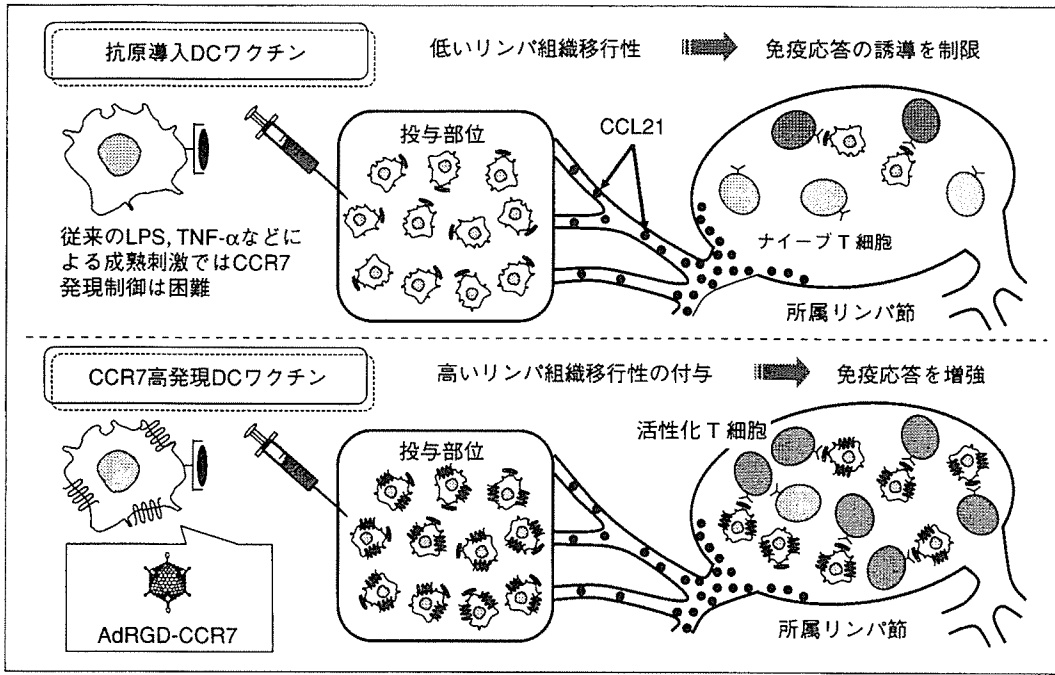


図3 CCR7発現DCのリンパ節移行性向上と抗腫瘍免疫応答の増強

活性化したDCは一過性にCCR7を発現することにより、恒常的に産生されているCCL21によりリンパ節へと移行することができる。しかし、従来までの成熟刺激ではCCR7の発現制御が難しく、所属リンパ節の移行性も乏しかった(上図)。そこで、投与DCにCCR7を安定かつ高発現させることにより、リンパ節への移行量が上昇し、抗腫瘍免疫応答を増強できるものと期待される(下図)。

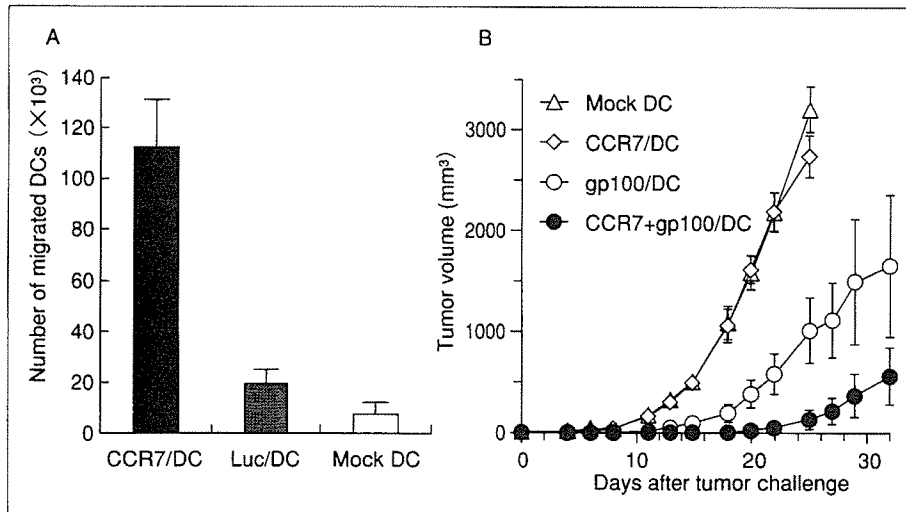


図4 CCR7発現DCのリンパ節移行性向上と抗腫瘍効果の増強

A: GFPトランスジェニックマウスよりDCを調製し、CCR7遺伝子(CCR7/DC)、luciferase遺伝子(Luc/DC)を導入した。(なお、遺伝子導入しないDCをMock DCとする。)各遺伝子導入DCを、 1.0×10^6 cells/mouseでマウス腹部皮内へ投与した。そして、所属リンパ節を回収し、移行したDC数をFlow Cytometryにより測定した。

B: 抗原遺伝子(gp100)とCCR7遺伝子を共導入したDCをマウスに免疫し、B16BL6細胞を移植後、腫瘍体積を経日的に測定した。

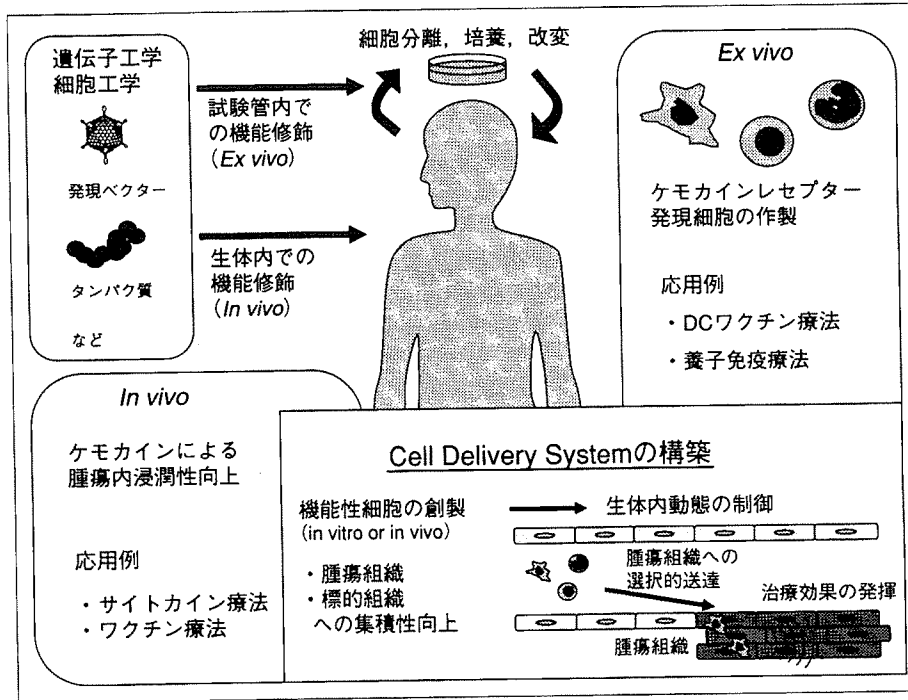


図5 ケモカイン・ケモカインレセプター連関を利用したCell Delivery Systemの概略

るメカニズムについては、抗原刺激や炎症反応に伴ってDC表面に発現誘導されるCCR7と、リンパ節から構成的に産生・分泌されているCCL21 (CCR7のリガンド)との連関が中心的な役割を果たすことが明らかになってきた。したがって、DCに抗原を導入するとともにCCR7を安定かつ豊富に発現させることができれば、生体に投与した後に積極的にリンパ組織へと移行し、免疫系を効率よく活性化できると考えられる(図3)。そこでDCに対しても高効率で遺伝子導入可能であるファイバーミュータント型アデノウイルスベクター(AdRGD)²¹⁾を用いてCCR7遺伝子を導入したところ²²⁾、調製したCCR7/DCは、CCL21の濃度に依存した遊走活性の上昇を示した。また、マウスに投与した際には、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性が認められた(図4A)。さらに、DCにCCR7と抗原(gp100)を共導入し、移行活性と抗原提示の両者による治療効果を検討したところ、リンパ節への移行活性の上昇に起因した抗腫瘍効果の増強が認められた(図4B)。

このように、ケモカインレセプターを用いる

ことで、投与細胞の体内動態を制御し、標的組織へのターゲティング能を付与することによる抗腫瘍効果の増強が可能であることが示された。こうした技術は、DCワクチン療法と同じく、体外から免疫細胞を投与する養子免疫療法にも応用可能であると考えられる。現在われわれは、CTLにケモカインレセプターを発現させ、腫瘍内に対応するケモカインを投与することによる、CTLの腫瘍集積性向上と治療効果の増強について検討しており、その有用性を立証していきたい。

ケモカイン・ケモカインレセプター連関を利用した抗腫瘍免疫療法の今後の展望

われわれは、免疫細胞を細胞性医薬品として捉え、本稿で概説したようなケモカイン・ケモカインレセプター連関を利用することにより、その生体内動態を制御し、抗腫瘍免疫療法の最適化を目指してきた。これは、薬物治療の最適化を目指したDrug Delivery System (DDS)の概念と同じであり、Cell Delivery Systemとも言うべき治療戦略である。

図5に、われわれの提唱するCell Delivery Sys-

temに基づく抗腫瘍免疫療法についてまとめた。われわれが目指す次世代の抗腫瘍免疫療法では、遺伝子工学・細胞工学的手法や、細胞培養技術など、さまざまなテクノロジーを駆使して抗腫瘍免疫反応を誘導するための種々の機能性細胞を創製し、さらにその細胞の機能を最大限に発揮するための標的指向化などの体内動態制御を行うことで、十分な治療効果を得ようとするものである。本稿では、ケモカインにより生体内の抗腫瘍エフェクター細胞を腫瘍組織内へと集積させる、あるいはケモカインレセプターを用いてDCワクチンを所属リンパ節へ遊走させる、すなわち免疫細胞の標的組織指向化により治療効果を増強させるわれわれの一例について概説した。これ以外にも投与細胞に標的組織特異的な抗体を発現させてターゲティング能を付与する試みや、細胞性医薬品の機能向上という観点から、細胞にアポトーシス抵抗性を付与することで投与細胞の生体内利用率を向上させるなど、生きた細胞を薬物として捉え、その細胞性製剤を疾病治療に適応するためのCell Delivery System研究を行っている。

今後、生体内における細胞の増殖や活性化、移動や分布など細胞の生理機能を制御する詳細な機構解明と、それらを医療分野に応用するための基盤技術の開発が進むことにより、このCell Delivery Systemが発展していくものと予想される。このCell Delivery System研究は、免疫療法にとどまらず、遺伝子治療や再生医療といった、機能性細胞を投与したり生体内に存在する細胞の機能を修飾したりすることによって疾病治療につなげようとする次世代細胞療法の有効性ならびに安全性の向上につながり、臨床応用実現に大いに貢献するものと期待される。

文 献

- 1) Butcher EC. Leukocyte-endothelial cell recognition : three (or more) steps to specificity and diversity. *Cell* 1991 ; 67 : 1033.
- 2) Springer TA. Traffic signals for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration : the multistep paradigm. *Cell* 1994 ; 76 : 301.
- 3) Butcher EC, Picker LJ. Lymphocyte homing and homeostasis. *Science* 1996 ; 272 : 60.
- 4) Hensbergen PJ, Wijnands PG, Schreurs MW, et al. The CXCR3 targeting chemokine CXCL11 has potent antitumor activity *in vivo* involving attraction of CD8+ T lymphocytes but not inhibition of angiogenesis. *J Immunother* 2005 ; 28 : 343.
- 5) van Deventer HW, Serody JS, McKinnon KP, et al. Transfection of macrophage inflammatory protein 1 alpha into B16 F10 melanoma cells inhibits growth of pulmonary metastases but not subcutaneous tumors. *J Immunol* 2002 ; 169 : 1634.
- 6) Lavergne E, Combadiere C, Iga M, et al. Intratumoral CC chemokine ligand 5 overexpression delays tumor growth and increases tumor cell infiltration. *J Immunol* 2004 ; 173 : 3755.
- 7) Gao JQ, Tsuda Y, Katayama K, et al. Antitumor effect by interleukin-11 receptor alpha-locus chemokine/CCL27, introduced into tumor cells through a recombinant adenovirus vector. *Cancer Res* 2003 ; 63 : 4420.
- 8) Okada N, Gao JQ, Sasaki A, 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* 2004 ; 317 : 68.
- 9) Gao JQ, Sugita T, Kanagawa N, et al. Anti-tumor responses induced by chemokine CCL19 transfected into an ovarian carcinoma model via fibromutant adenovirus vector. *Biol Pharm Bull* 2005 ; 28 : 1066.
- 10) Lavergne E, Combadiere B, Bonduelle O, et al. Fractalkine mediates natural killer-dependent anti-tumor responses *in vivo*. *Cancer Res* 2003 ; 63 : 7468.
- 11) Keyser J, Schultz J, Ladell K, et al. IP-10-encoding plasmid DNA therapy exhibits anti-tumor and anti-metastatic efficiency. *Exp Dermatol* 2004 ; 13 : 380.
- 12) Luo X, Yu Y, Liang A, et al. Intratumoral expression of MIP-1beta induces antitumor responses in a pre-established tumor model through chemo-attracting T cells and NK cells. *Cell Mol Immunol* 2004 ; 1 : 199.

- 13) Okada N, Sasaki A, Niwa M, et al. Tumor suppressive efficacy through augmentation of tumor-infiltrating immune cells by intratumoral injection of chemokine-expressing adenoviral vector. *Cancer Gene Ther* 2006 ; 13 : 393.
- 14) Hillinger S, Yang SC, Zhu L, et al. EBV-induced molecule 1 ligand chemokine (ELC/CCL19) promotes IFN-gamma-dependent antitumor responses in a lung cancer model. *J Immunol* 2003 ; 171 : 6457.
- 15) Fushimi T, Kojima A, Moore MA, et al. Macrophage inflammatory protein 3alpha transgene attracts dendritic cells to established murine tumors and suppresses tumor growth. *J Clin Invest* 2000 ; 105 : 1383.
- 16) Sharma S, Stolina M, Luo J, et al. Secondary lymphoid tissue chemokine mediates T cell-dependent antitumor responses *in vivo*. *J Immunol* 2000 ; 164 : 4558.
- 17) Kirk CJ, Hartigan-O'Connor D, Nickoloff BJ, et al. T cell-dependent antitumor immunity mediated by secondary lymphoid tissue chemokine : augmentation of dendritic cell-based immunotherapy. *Cancer Res* 2001 ; 61 : 2062.
- 18) Flanagan K, Glover RT, Horig H, et al. Local delivery of recombinant vaccinia virus expressing secondary lymphoid chemokine (SLC) results in a CD4 T-cell dependent antitumor response. *Vaccine* 2004 ; 22 : 2894.
- 19) Guo J, Wang B, Zhang M, et al. Macrophage-derived chemokine gene transfer results in tumor regression in murine lung carcinoma model through efficient induction of antitumor immunity. *Gene Ther* 2002 ; 9 : 793.
- 20) Huang H, Li F, Gordon JR, et al. Synergistic enhancement of antitumor immunity with adoptively transferred tumor-specific CD4+ and CD8+ T cells and intratumoral lymphotactin transgene expression. *Cancer Res* 2002 ; 62 : 2043.
- 21) Okada N, Masunaga Y, Okada Y, et al. Gene transduction efficiency and maturation status in mouse bone marrow-derived dendritic cells infected with conventional or RGD fiber-mutant adenovirus vectors. *Cancer Gene Ther* 2003 ; 10 : 421.
- 22) Okada N, Mori N, Koretomo R, et al. Augmentation of the migratory ability of DC-based vaccine into regional lymph nodes by efficient CCR7 gene transduction. *Gene Ther* 2005 ; 12 : 129.

* * *

ウイルス・非ウイルスベクター開発研究の最前線

水口 裕之^{a,b}

Recent Advance of Development of Viral and Non-viral Vectors for Gene Therapy

Hiroyuki MIZUGUCHI

^aLaboratory of Gene Transfer and Regulation, National Institute of Biomedical Innovation, 7-6-8 Asagi, Saito, Ibaraki City 567-0085, Japan, and ^bGraduate School of Pharmaceutical Sciences, Osaka University, 1-6 Yamadaoka, Suita City 567-0871, Japan

1990年に世界で最初の遺伝子治療がADA（アデノシンデアミナーゼ）欠損症に対して米国で行われてから16年が経過し、わが国においても同様の遺伝子治療が北海道大学で1995年に行われてから11年が経過した。その後、遺伝子治療は、先天的遺伝性疾患やがん・エイズを始めとする後天性の致死的な疾患だけでなく、ある程度の安全性が確立されたこともあり、バージャー病、閉塞性動脈硬化症などの末梢性の血管疾患を始めとする成人病に対しても適用が拡大されてきた。このような中、2003年には中国においてp53発現アデノウイルスベクターが世界で始めてがんに対する遺伝子治療医薬品として認可され（J. M. Wilson, *Hum. Gene Ther.* **16**, 1014-1015, 2005; Z. Peng, *Hum. Gene Ther.* **16**, 1016-1027, 2005）、既に3000人以上の患者に使用されている。なお、同ベクターは米国においても現在第3相試験を行っている。

一方で、現在行われている遺伝子治療は、少数の患者で安全性を主に評価する第1/2相レベルの臨床研究の段階であり、多数の患者で有効性を評価する第3相臨床研究は第2/3相の試験を加えても、全体の3.1%（プロトコール数当たり）に過ぎない（2006年現在）（<http://www.wiley.co.uk/genmed/clinical/>）。また、明らかな遺伝子治療での治療効果が認められた症例は、ADA欠損症や、X連鎖SCID（重症複合免疫不全症）、慢性肉芽腫症、血友病などに限られており（部分的な治療効果のケース

も含む）、現時点では遺伝子治療はまだまだ発展段階にあると言える。この主な原因は、これまでの遺伝子治療臨床研究で用いられてきたベクターが主に1990年代初期までに開発された第一世代のものであり、その性能が十分でないことが考えられている。遺伝子治療の更なる進展のためには、その根幹をなす遺伝子導入技術の発展、すなわち高性能なベクターの開発が必要不可欠であり、様々なアプローチからウイルス及び非ウイルスベクターの改良研究が行われている。

本特集では、新しいタイプのアデノウイルスベクターとアデノ随伴ウイルスベクターについて、それぞれ櫻井文教先生（医薬基盤研究所）、水上浩明先生（自治医科大学）に御執筆頂き、従来の両ベクターとは異なった特性を有する新規ベクターについて解説頂いた。非ウイルスベクターの開発研究に関しては、西川元也先生（京都大学）にNFκBやTLR9（Toll Like Receptor 9）による生体反応（認識）を利用したプラスミドベクターによる*in vivo*遺伝子発現の最適化について、谷山義明先生（大阪大学）に超音波を利用したプラスミドやデオキシ核酸の導入法について御執筆して頂いた。そして、アデノウイルスベクターと非ウイルスベクターの細胞内動態と発現機構（効率）の比較解析について秋田英万先生（北海道大学）に御執筆頂き、細胞内動態制御の観点での今後のプラスミドベクター開発の課題点について解説頂いた。遺伝子治療用ベクターの開発研究『vectorology』の発展が、効果的な遺伝子治療法の開発と進展に大きく貢献することを期待する次第である。

^a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、^b大阪大学大学院薬学研究科
e-mail: mizuguch@nibio.go.jp

35型アデノウイルスベクターの開発—遺伝子改変動物並びに霊長類を用いた検討—

櫻井文教,^{*,a} 川端健二,^a 水口裕之^{a,b}

Characterization of Adenovirus Serotype 35 Vectors Using Genetically Modified Animals and Nonhuman Primates

Fuminori SAKURAI,^{*,a} Kenji KAWABATA,^a and Hiroyuki MIZUGUCHI^{a,b}^aLaboratory of Gene Transfer and Regulation, National Institute of Biomedical Innovation, 7-6-8 Asagi, Saito, Ibaragi City 567-0085, Japan, and ^bGraduate School of Pharmaceutical Sciences, Osaka University, 1-6 Yamadaoka, Suita City 565-0871, Japan

(Received June 29, 2006)

Recombinant Adenovirus (Ad) vectors are considered to be a promising gene delivery vehicle of high utility because they are easy to construct, can be produced at high titers, and efficiently transduce various types of cells. Ad vectors commonly used in the world, including clinical trials, are composed of Ad serotype 5 (Ad5), which belongs to subgroup C. In recent years, however, it has become apparent that Ad5 vectors have some drawbacks, such as high seroprevalence of anti-Ad5 antibodies in adults and low transduction efficiencies of Ad5 vectors in cells lacking a primary receptor for Ad5, coxsackievirus and adenovirus receptor (CAR). To overcome these limitations of Ad5 vectors, we have developed a novel type of Ad vector, which is composed of Ad serotype 35 (Ad35), belonging to subgroup B. Ad35 vectors recognize human CD46, not CAR, as a cellular receptor for infection. Human CD46 is expressed in almost all of human cells, leading to a broad tropism of Ad35 vectors to human cells, in contrast, expression of rodent CD46 is limited to the testis. Therefore, *in vivo* transduction properties of Ad35 vectors are not appropriately evaluated in normal mice. In order to evaluate the *in vivo* transduction properties of Ad35 vectors, Ad35 vectors were applied to human CD46-transgenic mice and nonhuman primates, which express CD46 in a similar pattern to humans. The data obtained using CD46-transgenic mice and nonhuman primates would provide valuable information towards clinical applications of Ad35 vectors.

Key words—adenovirus vectors; serotype; CD46; gene therapy

1. はじめに

遺伝子治療では遺伝子(核酸)が薬物(主剤)そのものであると考えられるが、通常の薬物とは異なり、多くの場合分子量 10^6 以上の巨大高分子である遺伝子を疾患部位の細胞の核にまで到達させる必要がある。したがって、遺伝子を細胞内、そして核内にまで送達するベクターが遺伝子治療の成否を決める極めて重要な要素であると言っても過言ではない。遺伝子導入用ベクターは、ウイルスを基本骨格としウイルス本来が兼ね備えている遺伝子送達メカニズムを利用したウイルスベクターと、脂質や高分子ポリマーを利用した非ウイルスベクターとに大別

される。これまでウイルス・非ウイルスベクターを問わず多くの遺伝子導入用ベクターが開発されてきたが、なかでもアデノウイルス(Ad)ベクターは遺伝子導入用ベクターとして多くの長所を有することから、様々なアプローチからベクター改良研究が盛んに行われている。

Adは軽い風邪を引き起こすウイルスの1つで、約36 kbの直鎖状二本鎖DNAをゲノムに持つエンベロープを持たないウイルスである。その形状はFig. 1に示すように、直径約80 nmの正二十面体構造をしており、その頂点には感染に大きな役割を担っている12個のペントン(ファイバー及びペントンベース)と呼ばれる突起構造を持っている。Adはこれまで多くの動物から単離されているが、ヒトAdは現在までに51種類の血清型が同定されており、赤血球凝集活性の違いなどからA—Fの6つのSubgroupに分類されている(Table 1)。¹⁾ 現在汎用

^a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(〒567-0085 茨木市彩都あさぎ7-6-8), ^b大阪大学大学院薬学研究科(〒565-0871 吹田市山田丘1-6)

*e-mail: sakurai@nibio.go.jp

本総説は、日本薬学会第126年会シンポジウムS7で発表したものを中心に記述したものである。

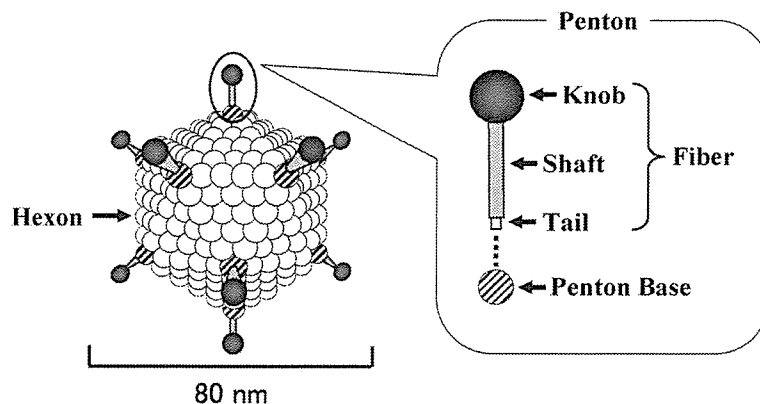


Fig. 1. A Schematic Diagram of Human Adenovirus

The double-stranded genomic DNA is packaged in the icosahedral particle with fibers projecting from the twelve vertices.

Table 1. Human Adenovirus Serotypes

Subgroup	Serotypes	Receptor ^{*)}
A	12, 18, 31	CAR
B	3, 7, 11, 14, 16, 21, 34, 35, 50	CD46
C	1, 2, 5, 6	CAR
D	8-10, 13, 15, 17, 19, 20, 22-30, 32, 33, 36-39, 42-49, 51	CAR
E	4	CAR
F	40, 41	CAR

CAR: coxsackievirus-adenovirus receptor. ^{*)} Some Ad serotypes recognize other receptors different from CAR and CD46.

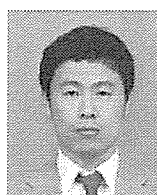
されている Ad ベクターは Subgroup C に属する 5 型 Ad (若しくは 2 型) を基本骨格としている。5 型 Ad ベクターは全遺伝子治療臨床研究の約 25% で用いられており (2006 年 1 月現在), 最近では遺伝子機能解析のためのツールとして基礎研究の場においても汎用されている。しかし近年, 後述するように 5 型 Ad ベクターの抱える様々な問題が明らかとなってきた。そこでわれわれは 5 型 Ad ベクターの問題点を解決すべく, Subgroup B に属する 35 型 Ad を基本骨格とした新規 Ad ベクターを開発し, その機能解析を進めている。²⁻⁶⁾ 本稿では, われわれがこれまでに取り組んできた研究成果について紹介したいと思う。

2. 5 型アデノウイルスベクターの問題点

1993 年にアメリカにおいて嚢胞性繊維症に対して行われた 5 型 Ad ベクターによる初めての臨床試験以降,⁷⁾ 5 型 Ad ベクターは癌や先天性遺伝子疾患などの臨床研究や多くの基礎研究に用いられてきた。これらの研究は 5 型 Ad ベクターの有用性を示

すと同時に, 以下に示すような 5 型 Ad ベクターが抱える問題点を明らかにした。

1) 第一受容体である Coxsackievirus and adenovirus receptor (CAR) の発現が低い細胞への遺伝子導入効率が低い。CAR は 1997 年に Bergelson らによって 2 型及び 5 型 Ad 及び Coxsackie B virus の受容体として同定された分子量約 46 KDa の膜タンパク質で,⁸⁾ 上皮細胞や肝細胞などで多く発現している。Subgroup B に属する Ad を除くほぼすべての Ad が CAR を第一受容体としている。⁹⁾ したがって 5 型 Ad ベクターは CAR 陽性細胞に対しては効率よく感染し高い遺伝子導入効率を示すが, CAR 陰性細胞では十分な遺伝子導入効率が得られない。CAR 陰性細胞は意外にも多く, 遺伝子治療の重要な標的細胞である造血幹細胞を始めとする血液細胞, 血管平滑筋細胞, 樹状細胞などが CAR 陰性である。また癌細胞においては, 癌の悪性度の進行に伴い CAR の発現が低下することが報告されている。^{10,11)} さらに最近の研究では CAR がタイトジャンクションの形成に関与することが報告されており,^{12,13)} CAR 陽性細胞においても CAR がタイトジャンクション部位に局在している場合には, 立体障



櫻井文教

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研究員。1972 年静岡県生まれ。京都大学薬学部卒業。京都大学大学院薬学研究科博士課程修了 (指導教官 橋田充教授)。2001 年国立医薬品食品衛生研究所生物薬品部リサーチレジデント (早川堯夫部長)。

2003 年国立医薬品食品衛生研究所遺伝子細胞医薬部研究員 (山口照英部長)。2005 年より現職 (水口裕之プロジェクトリーダー)。

害により 5 型 Ad ベクターが CAR に到達できない可能性が指摘されている。

2) 既に多くの成人が 5 型 Ad に対する抗体を保持している。5 型 Ad は風邪の原因ウイルスの 1 つであることが知られており、成人の多くは 5 型 Ad に対する抗体を既に有している。Seshidhar らは、成人の 45—66% は 5 型 Ad に対する抗体を保持していると報告している。¹⁴⁾ 既存抗体は *in vivo* 遺伝子導入効率を大きく減弱させるだけでなく、5 型 Ad ベクターの毒性を増強する可能性が指摘されている。¹⁵⁾ すなわち、抗 5 型 Ad 抗体を保持しているヒトに 5 型 Ad ベクターを投与した場合には、抗体により遺伝子導入が阻害され十分な治療効果が得られないだけでなく、大きな副作用を起こす危険性がある。

3. 35 型アデノウイルスベクターの特徴

以上のような問題点を克服するため、われわれは Subgroup B に属する 35 型 Ad を基本骨格とした新規 Ad ベクターの開発を行った。35 型 Ad のベクター化に着目した理由としては (Fig. 2),

1) 受容体としてヒト CD46 (membrane cofactor protein) を認識して細胞に感染するため、5 型 Ad とは異なる感染域を示す。35 型 Ad を始めとする Subgroup B に属する Ad の受容体は長らく不明であった (われわれが 35 型 Ad ベクターの開発に成功した時点においても不明であった)。しかしなが

ら 35 型 Ad が CAR 以外の分子を受容体として認識すること,⁹⁾ 血球細胞に対し高い親和性を有すること¹⁶⁾ が既に明らかとなっていたことから、われわれは 35 型 Ad ベクターが血液細胞を始めとして 5 型 Ad ベクターでは遺伝子導入不可能な細胞に対しても効率よく感染するのではないかと考えた。実際に開発した 35 型 Ad ベクターの遺伝子導入特性を解析したところ、35 型 Ad ベクターは CAR 陽性細胞だけでなく、ヒト CD34 陽性細胞を始めとする CAR 陰性細胞に対しても高い遺伝子導入効率を示した。²⁻⁴⁾ その後 2003 年にヒト CD46 が Subgroup B Ad の受容体であることが報告されたが、^{17,18)} CD46 はヒトではほぼすべての細胞で発現しており、35 型 Ad ベクターの広い感染域を反映したものであった。

2) 35 型 Ad に対する抗体を保持している成人の割合が低い。先述のように成人の抗 5 型 Ad 抗体保持率は 45% 以上であるが、Subgroup B Ad に対する抗体保持率は総じて低いことが報告されている。特に 35 型 Ad に対する抗体保持率は 20% 以下と低いことから、^{14,19)} 35 型 Ad ベクターの遺伝子導入活性が既存抗体により阻害される可能性は低い。また 35 型 Ad は 5 型 Ad とは異なる Subgroup に属することから、抗 5 型 Ad 抗体による阻害を受けない。われわれが抗 5 型 Ad 血清存在下における 5 型並びに 35 型 Ad ベクターの遺伝子導入効率を検討した

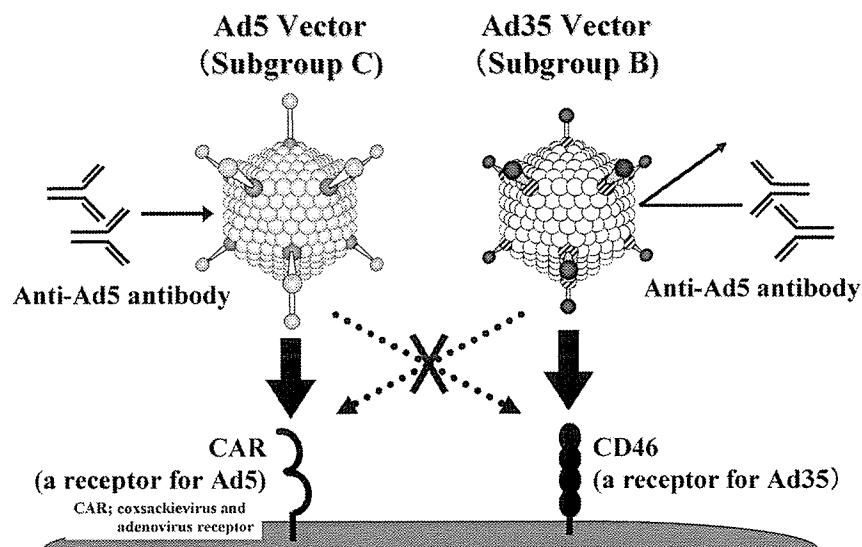


Fig. 2. A Schematic Diagram of Properties of Ad5 and Ad35 Vectors

Ad5 vectors infect cells via interaction with CAR (coxsackievirus and adenovirus receptor), on the other hand, Ad35 vectors recognize human CD46 for infection. Anti-Ad5 antibodies inhibit infection of Ad5 vectors, not Ad35 vectors.

ところ、5型 Ad ベクターの遺伝子導入効率は抗5型 Ad 血清の濃度依存的に減少したが、35型 Ad ベクターの遺伝子導入効率は影響を受けなかった。

一方で、ファイバータンパク質だけを35型 Ad などの Subgroup B に属する Ad に由来するものに置換し、その他の領域は従来の5型 Ad から構成されたファイバー置換型5型 Ad ベクターも開発されている。^{20,21)} ファイバーの先端部分であるノブ領域が CD46 に直接結合する部位であることから、ファイバータンパク質のみを置換することで感染域を変えることが可能である。しかしほとんどの抗 Ad 中和抗体はヘキソン領域を認識するため、²²⁾ ファイバー置換型5型 Ad ベクターでは抗5型 Ad 抗体による阻害を回避することはできない。

4. CD46 の特徴

Subgroup B Ad の受容体である CD46 は、主に4つの isoform (BC1, BC2, C1, C2) が存在する分子量約 55—65 KDa の糖タンパク質で、4つの Short consensus repeat (SCR), transmembrane domain, cytoplasmic tail などから構成されている (Fig. 3)。CD46 は本来、生体では補体成分である C3b や C4b を分解することにより、自己の細胞を補体による攻撃から守る役割を担っている。また Subgroup B Ad のみならず、麻疹ウイルス (一部の strain)、ヒトヘルペスウイルス type 6, Nesseria など

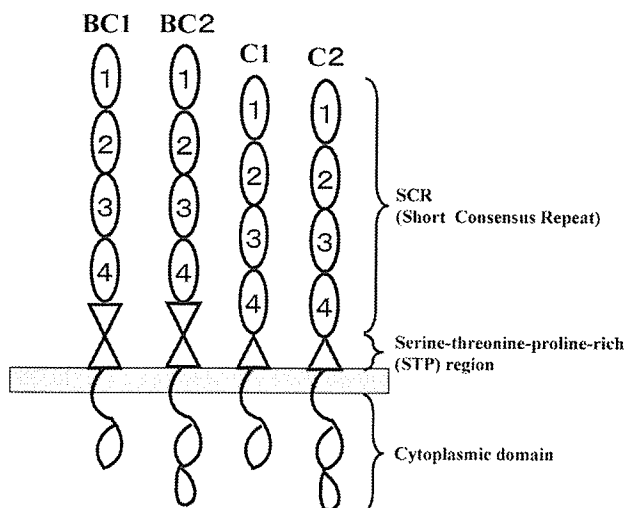


Fig. 3. A Schematic Diagram of Human CD46

Human CD46 is ubiquitously expressed in almost all human cells mainly as four isoforms (BC1, BC2, C1, C2) that are derived via alternative splicing. Human CD46 is composed of four cysteine-rich short consensus repeats (SCRs), a serine-threonine-proline-rich (STP) region, a short region of unknown function, a hydrophobic transmembrane domain, and a carboxy-terminal cytoplasmic domain.

ども CD46 を感染受容体としている。^{23,24)} これらの病原体については CD46 のどの部位が感染に関与するのかが報告されており、Subgroup B Ad についても先端領域に位置する SCR1 及び 2 が感染に重要であることが明らかとなっている。^{6,25)} CAR とは異なり、CD46 はヒトでは血液細胞を始め、ほぼすべての細胞において発現しているのに対し (赤血球では発現していない)、げっ歯類においては CD46 は精巣でしか発現していないこと、またマウス CD46 はヒト CD46 と比較してその相同性は約 46% と低いことが知られている。²⁶⁾ そのため 35 型 Ad ベクターを通常のマウスに静脈内投与した場合の各臓器における遺伝子導入効率は、5 型 Ad ベクターと比較し極めて低いものであった。³⁾

5. CD46 トランスジェニックマウスを用いた 35 型 Ad ベクターの機能解析

そこでわれわれは、35 型 Ad ベクターが通常のマウスで遺伝子発現を示さないのは、受容体である CD46 が発現していないことが原因ではないかと考え、ヒトと同様にヒト CD46 をほぼ全臓器で発現している CD46 トランスジェニック (CD46TG) マウス (大阪大学・岡部勝先生より供与) を用いて 35 型 Ad ベクターの遺伝子導入特性を解析した。⁵⁾ まず CD46TG マウスにおける CD46 発現量をウエスタンブロットにて確認したところ、ヒトと同様にほぼすべての臓器で CD46 の発現が確認された。次に 35 型 Ad ベクターを野生型及び CD46TG マウスに静脈内及び腹腔内投与したところ、両投与経路ともに CD46TG マウスにおいて野生型マウスよりも有意に高い遺伝子導入効率が得られた (Fig. 4)。特に、両方の相同染色体に CD46 遺伝子を有するホモ CD46TG マウスの肝臓での遺伝子導入効率は、静脈内投与では野生型マウスの約 10 倍、腹腔内投与では約 500 倍高い値を示した。しかしながら、5 型 Ad ベクターと比較して、35 型 Ad ベクターによる遺伝子導入効率は CD46TG マウスにおいても依然低く、実験当初に期待していたような劇的な遺伝子導入効率の上昇はみられなかった。例えば 35 型 Ad ベクターをホモ CD46TG マウスに静脈内投与したときの肝臓及び脾臓での遺伝子発現量は、5 型 Ad ベクターを野生型マウスに静脈内投与した場合のそれぞれ約 20000 分の 1、及び 50 分の 1 であった。さらに 35 型 Ad ベクターを CD46TG マウスに

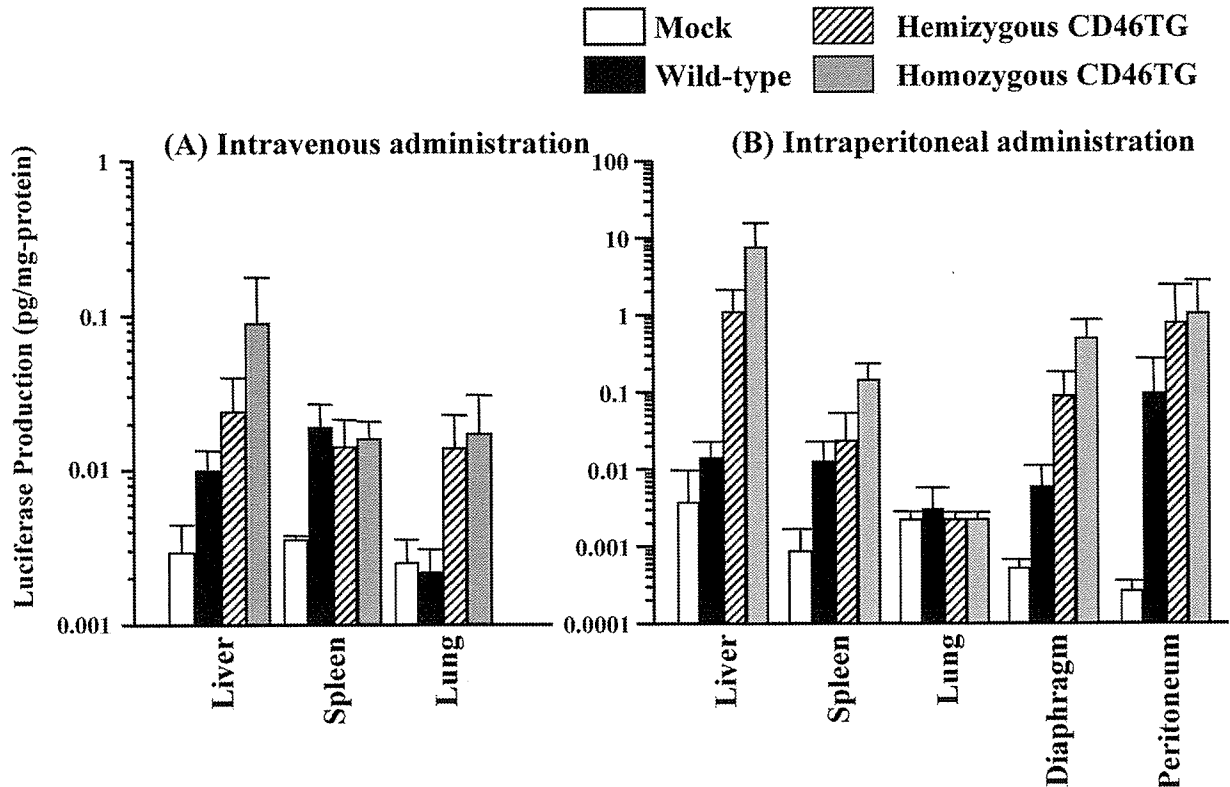


Fig. 4. Luciferase Production in CD46TG and Wild-type Mice after Intravenous and Intraperitoneal Administration of Ad35 Vectors Expressing Firefly Luciferase

(A) Luciferase production in the organs after intravenous administration of Ad35 vectors. (B) Luciferase production in the organs after intraperitoneal administration of Ad35 vectors. Ad35 vectors (1.5×10^{10} VP) was administered to wild-type mice (C57Bl6, 5 weeks old) and hemizygous (Hemi TG, 5 to 6 weeks old) and homozygous (Homo TG, 5 to 6 weeks old) CD46TG mice. After 48 h, the organs were harvested and homogenized, and luciferase production was measured by a luminescence assay system (PicaGene 5500; Toyo Inki, Japan). All data are represented as mean \pm S.D. ($n=4$, intravenous administration; $n=6$, intraperitoneal administration).

腹腔内投与した場合に遺伝子発現を示した細胞の大部分は臓器表面の中皮細胞であった (Fig. 5).

6. カニクイザルを用いた 35 型 Ad ベクターの機能解析

35 型 Ad ベクターは CD46TG マウスにおいても十分な遺伝子発現を示さなかったが、これに関しては主に 2 つの原因が推察された。第一に CD46 が主に basolateral 側に発現しているために、²⁷⁾ 細胞外マトリックスなどの立体障害により 35 型 Ad ベクターが CD46 に到達できないことが考えられた。あるいは、35 型 Ad には CD46 以外の未知の受容体の存在が示唆されているが、²⁸⁾ マウスではその受容体が発現していない可能性があった。そこでわれわれは、ヒトと同様に生来から CD46 を発現している霊長類を用いて 35 型 Ad ベクターの機能評価を行った。35 型 Ad ベクターをカニクイザルに静脈内投与し、投与 96 時間後の各臓器における遺伝子発現並びにベクター集積量を検討した。その結果、35

型 Ad ベクターのゲノム DNA は肝臓で最も多く検出され、その他、肺、腎臓、心臓においても高い値を示した。一方で各臓器における遺伝子発現を検討したところ、ほとんど遺伝子発現は観察されず、CD46TG マウスを用いた場合と同様の傾向を示した。今後われわれは霊長類を用いて 35 型 Ad ベクターの機能解析をさらに進めるとともに、臓器局所への投与による遺伝子導入実験も計画している。これらの実験により 35 型 Ad ベクターの臨床応用に向けて重要な知見が得られるものと期待している。

7. おわりに

以上、本稿ではわれわれが開発した新しいタイプの Ad ベクターである 35 型 Ad ベクターの機能解析 (遺伝子導入特性解析) を遺伝子改変動物並びに霊長類を用いて行った研究について紹介した。遺伝子治療研究が始まって以来、精力的に基礎研究並びに臨床試験が進められ、貴重な数多くの情報が蓄積されてきた。今、これらの情報は高性能なベクター