

Fig. 5. X-gal Staining of the Peritoneal Organs of Homozygous CD46TG Mice Receiving β -Galactosidase-expressing Ad35 Vectors (a) Liver and (c) kidney sections from homozygous TG mice injected with Ad35 vectors. (b) Liver and (d) kidney sections from mock-infected homozygous TG mice. Ad35 vectors were injected intraperitoneally into homozygous CD46TG mice at a dose of 7.5×10^{10} VP/mouse. At 2 days postadministration, the organs were recovered, fixed, and stained by using X-gal reagents. LacZ-positive cells are indicated by the arrows.

の開発・改良へと着実にフィードバックされている。今後もこのような積み重ねがさらに高性能なベクター及び治療法の開発へとつながり、かならずや遺伝子治療のブレイクスルーになるものと期待している。

謝辞 本稿で紹介した研究は、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、国立医薬品食品衛生研究所遺伝子細胞医薬部及び生物薬品部において行われたものであり、実験に協力していただいた関係者の皆様に深く感謝いたします。またCD46TG マウスを供与していただきました大阪大学・岡部 勝先生、井上直和先生、また霊長類への遺伝子導入実験に協力していただきました霊長類医学研究センター・寺尾恵治先生始め関係者の皆様にこの場をお借りして厚く御礼申し上げます。

REFERENCES

- 1) Havenga M. J., Lemckert A. A., Ophorst O. J., van Meijer M., Germeraad W. T., Grimbergen J., van Den Doel M. A., Vogels R., van Deutekom J., Janson A. A., de Bruijn J. D., Uytdehaag F., Quax P. H., Logtenberg T., Mehtali M., Bout A., *J. Virol*, **76**, 4612-4620 (2002).
- 2) Sakurai F., Mizuguchi H., Hayakawa T., *Gene Ther.*, **10**, 1041-1048 (2003).
- 3) Sakurai F., Mizuguchi H., Yamaguchi T., Hayakawa T., *Mol. Ther.*, **8**, 813-821 (2003).
- 4) Sakurai F., Kawabata K., Yamaguchi T., Hayakawa T., Mizuguchi H., *Gene Ther.*, **12**, 1424-1433 (2005).
- 5) Sakurai F., Kawabata K., Koizumi N., Inoue N., Okabe M., Yamaguchi T., Hayakawa T., Mizuguchi H., *Gene Ther.*, **13**, 1118-1126 (2006).
- 6) Sakurai F., Murakami S., Kawabata K., Okada N., Yamamoto A., Seya T., Hayakawa T., Mizuguchi H., *J. Control. Release*, **113**, 271-278 (2006).
- 7) Crystal R. G., McElvaney N. G., Rosenfeld M. A., Chu C. S., Mastrangeli A., Hay J. G., Brody S. L., Jaffe H. A., Eissa N. T., Danel C., *Nat. Genet.*, **8**, 42-51 (1994).
- 8) 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).
- 9) Roelvink P. W., Lizonova A., Lee J. G., Li Y., Bergelson J. M., Finberg R. W., Brough D. E., Kovessi I., Wickham T. J., *J. Virol.*, **72**, 7909–7915 (1998).
 - 10) Okegawa T., Pong R. C., Li Y., Bergelson J. M., Sagalowsky A. I., Hsieh J. T., *Cancer Res.*, **61**, 6592–6600 (2001).
 - 11) Huang K. C., Altinoz M., Wosik K., Larochele N., Koty Z., Zhu L., Holland P. C., Nalbantoglu J., *Int. J. Cancer*, **113**, 738–745 (2005).
 - 12) Cohen C. J., Shieh J. T., Pickles R. J., Okegawa T., Hsieh J. T., Bergelson J. M., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **98**, 15191–15196 (2001).
 - 13) Coyne C. B., Bergelson J. M., *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **57**, 869–882 (2005).
 - 14) Seshidhar Reddy P., Ganesh S., Limbach M.P., Brann T., Pinkstaff A., Kaloss M., Kaleko M., Connelly S., *Virology*, **311**, 384–393 (2003).
 - 15) Vlachaki M. T., Hernandez-Garcia A., Ittmann M., Chikara M., Aguilar L. K., Zhu X., Teh B. S., Butler E. B., Woo S., Thompson T. C., Barrera-Saldana H., Aguilar-Cordova E., *Mol. Ther.*, **6**, 342–348 (2002).
 - 16) Segerman A., Mei Y. F., Wadell G., *J. Virol.*, **74**, 1457–1467 (2000).
 - 17) Segerman A., Atkinson J. P., Marttila M., Dennerquist V., Wadell G., Arnberg N., *J. Virol.*, **77**, 9183–9191 (2003).
 - 18) Gaggar A., Shayakhmetov D. M., Lieber A., *Nat. Med.*, **9**, 1408–1412 (2003).
 - 19) Nwanegbo E., Vardas E., Gao W., Whittle H., Sun H., Rowe D., Robbins P. D., Gambotto A., *Clin. Diagn. Lab. Immunol.*, **11**, 351–357 (2004).
 - 20) Mizuguchi H., Hayakawa T., *Gene*, **285**, 69–77 (2002).
 - 21) Stecher H., Shayakhmetov D. M., Stamato-yannopoulos G., Lieber A., *Mol. Ther.*, **4**: 36–44 (2001).
 - 22) Sumida S. M., Truitt D. M., Lemckert A. A., Vogels R., Custers J. H., Addo M. M., Lockman S., Peter T., Peyerl F. W., Kishko M. G., Jackson S. S., Gorgone D. A., Lifton M. A., Essex M., Walker B. D., Goudsmit J., Havenga M. J., Barouch D. H., *J. Immunol.*, **174**, 7179–7185 (2005).
 - 23) Cattaneo R., *J. Virol.*, **78**, 4385–4388 (2004).
 - 24) Russell S., *Tissue Antigens*, **64**, 111–118 (2004).
 - 25) Fleischli C., Verhaagh S., Havenga M., Sirena D., Schaffner W., Cattaneo R., Greber U. F., Hemmi S., *J. Virol.*, **79**, 10013–10022 (2005).
 - 26) Tsujimura A., Shida K., Kitamura M., Nomura M., Takeda J., Tanaka H., Matsumoto M., Matsumiya K., Okuyama A., Nishimune Y., Okabe M., Seya T., *Biochem. J.*, **330** (Pt 1), 163–168 (1998).
 - 27) Maisner A., Zimmer G., Liszewski M. K., Lublin D. M., Atkinson J. P., Herrler G., *J. Biol. Chem.*, **272**, 20793–20799 (1997).
 - 28) Segerman A., Arnberg N., Erikson A., Lindman K., Wadell G., *J. Virol.*, **77**, 1157–1162 (2003).

ウイルスベクターと非ウイルスベクターの細胞内動態の定量的解析に基づいた 遺伝子ベクター開発へのアプローチ

秋田英万,^{*a,b} 濱 進,^{a,b} 水口裕之,^c 原島秀吉,^{a,b}

Development of Non-viral Vector Based on the Quantitative Comparison of Intracellular Trafficking with Viral Vector

Hidetaka AKITA,^{*a,b} Susumu HAMA,^{a,b} Hiroyuki MIZUGUCHI,^c and Hideyoshi HARASHIMA^{a,b}

^aFaculty of Pharmaceutical Sciences, Hokkaido University, Kita-12, Nishi-6, Kita-ku, Sapporo City 060-0812, Japan, ^bThe Core Research for Evolutional Science and Technology (CREST), Japan Science and Technology Agency (JST), and ^cLaboratory of Gene Transfer and Regulation, National Institute of Biomedical Innovation, 7-6-8 Asagi, Saito, Ibaraki City 567-0085, Japan

(Received July 3, 2006)

For the development of efficient gene vector, intracellular processes such as cellular uptake, endosomal release and nuclear delivery must be overcome. Viruses have also evolved and have developed sophisticated mechanisms for controlling intracellular trafficking for the efficient delivery of their genomes to nuclei in host cells for symbiosis. In the light of these mechanisms, various kinds of artificial devices have been developed to overcome the intracellular barriers. However, in the majority of studies, variation of the transfection activity before and after the modification of devices was evaluated, and intracellular trafficking remained unclear. Therefore, it is understood to recognize which of the intracellular barrier should be intensively improved to enhance the transfection activity. To clarify the rate-limited process in the current non-viral vector, we compared the intracellular trafficking between adenovirus and LipofectAMINE PLUS. As a result, we found that difference of the transfection efficiency between adenovirus and LipofectAMINE PLUS was dominantly derived from the differences on transcription activity. Therefore it is essential to consider the regulation of the intranuclear events to improve the transfection activity of artificial vector.

Key words—adenovirus; lipoplex; quantification; intracellular trafficking

1. はじめに

地球上に生物が誕生してから、RNA あるいは DNA を核に持つウイルスは、様々な環境下において、生物とともに共存、進化を繰り返してきた。生物の多様性に伴い、ウイルスも進化と淘汰を繰り返すことにより多様性を獲得し、現在ではその感染メカニズムも多岐に渡る。高い感染能を獲得する上では、ウイルスは宿主細胞の核内にそのゲノムを効率的に導入することが必須であり、細胞内に侵入したのちの細胞内動態を制御するための非常に巧みな機

構を進化とともに獲得してきた。1980年代にカチオン性リポソームを用いた細胞への遺伝子導入が試みられてから、安全性の高い高効率な非ウイルスベクターを開発するための多くの工夫がなされてきたが、その歴史はまだ25年とウイルスベクターと比較して非常に浅い。したがって、ウイルスベクターは非ウイルスベクター開発を行う上で学べき存在として君臨する。

効率的な遺伝子ベクターを開発するためには、組織レベルにおけるターゲティングのみではなく、目的組織に到達したのちの細胞内取り込みやエンドソーム脱出、核膜透過などを効率化するための、さらに緻密な細胞内動態制御が必要である (Fig. 1)。本稿ではこれらのバリアを突破するための様々な試みを紹介する。

2. 取り込み過程

非ウイルスベクターの細胞への取り込み過程にお

^a北海道大学大学院薬学研究院 (〒060-0812 札幌市北区北12条西6丁目), ^b科学技術振興機構戦略的創造研究推進事業 (〒332-0012 川口市本町4-1-8 川口センタービル), ^c独立行政法人医薬基盤研究所 (〒567-0085 茨木市彩都あさぎ7-6-8)

*e-mail: akita@pharm.hokudai.ac.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。

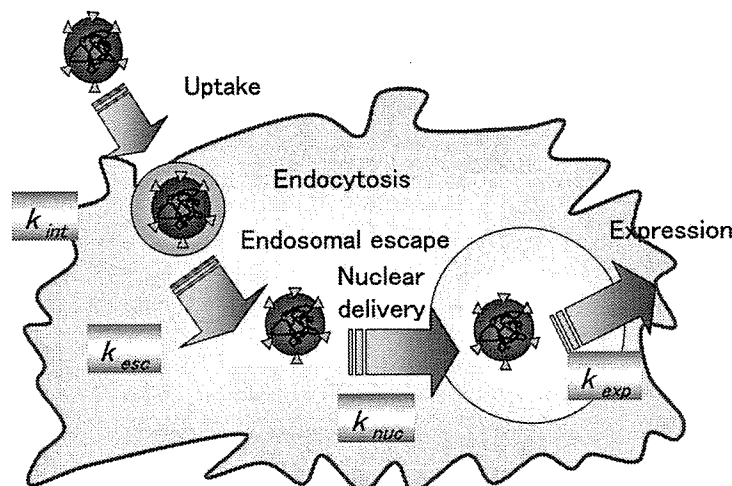


Fig. 1. Intracellular Barriers Rate-limiting Transfection Activity

To achieve an efficient transfection intracellular trafficking such as cellular uptake, endosomal escape, nuclear delivery must be overcome.

いては、(A) Absorptive mediated endocytosis と、(B) Receptor mediated endocytosis の2種に大別することができる。前者のメカニズムにおいては、遺伝子のリン酸基に由来する負電荷を利用してカチオン性リポソームや、カチオン性ポリカチオンと複合体を形成させることにより、静電的相互作用を利用して細胞表面との親和性を上昇させるものである。一方で、これらの機構を狙ったアプローチでは、遺伝子ベクターの細胞選択性を獲得できず、その臨床的応用は *ex vitro* あるいは局所投与に限定される。細胞選択性を出すための最も有効な手段として、後者の経路を狙った細胞表面レセプターに対するリガンドが用いられている。これらの取り込みに共通することは、クラスリン被覆小胞を介して取り込まれるという点である。

一方で最近、クラスリン被覆小胞を介さない細胞内取り込み経路についても注目を集めており、HIV由来 TAT タンパクに代表されるアルギニンに富むドメインペプチド融合タンパクは、クラスリン非依存的なマクロピノサイトーシスにより取り込まれることが示唆されている。またこの経路はアデノウイルスの侵入過程にも重要な役割を果たしていることが示唆されている。アデノウイルスは、細胞表面の coxsackie and adenovirus receptor (CAR) とファイバー部位が結合したのち、さらに penton base の RGD モチーフを介して細胞表面のインテグリンと結合する。¹⁾ RGD と penton base の結合は、宿主細胞側に p85/p110 phosphoinositide-3-OH kinase

(PI3K) の活性化や、²⁾ アクチン重合とマクロピノサイトーシスなどが誘起されると考えられている。³⁾ しかし、この経路が全体の取り込みの何パーセントに相当するかなど、不明な点が多い。

それでは、人工ベクターをこのようなマクロピノサイトーシス経路を介して積極的に取り込ませることはできるのだろうか？われわれは、リポソーム表面に膜透過性ペプチドであるオクタアルギニンを修飾した R8 リポソームを構築し、取り込み経路を解析した。その結果、低密度修飾の R8 リポソームは従来型のクラスリン被覆小胞により、また、高密度修飾の R8 リポソームはマクロピノサイトーシス経路で取り込まれることが明らかとなった。⁴⁾ さらに、低温条件下によって取り込ませることによって、この高密度修飾リポソームは、膜系輸送を介さずに細胞内に取り込まれることが明らかとなった。⁵⁾ これらに遺伝子を封入し、遺伝子発現を評価した場合、低密度 R8 修飾リポソームと比べて、高密度 R8 修飾リポソームにおける発現は、取り込み量からでは説明できないほど劇的に高いことが明らか



秋田英万

北海道大学大学院薬学研究院助手。1975年生まれ。東京大学薬学部卒業、東京大学大学院薬学系研究科修士・博士課程修了。2002年に博士号(薬学)を取得後、日本学術振興会特別研究員を経て、2002年7月より北海道大学大学院薬学研究院助手に就任、現在に至る。遺伝子の細胞内イメージングと動態制御を中心に研究を行っている。

かとなった。さらに、ローダミンを内封したりポソームの細胞内挙動を解析すると、低密度修飾の場合に比べ、高密度の場合の方が有意に長く蛍光シグナルが残ることが明らかとなった。このことは、低密度修飾の場合では、クラスリン被覆小胞によって取り込まれ、速やかにリソソームによって分解してしまうのに対し、高密度修飾では、マクロピノサイトーシスによって取り込まれるために分解経路を免れることを示唆するものである。⁴⁾ 一方、高密度修飾遺伝子封入リポソームに着目すると、低温によって取り込ませた場合、取り込み量は予想と反して、常温時のものと比べて若干低い程度であった。しかし、遺伝子の発現効率は、常温に取り込ませたときに対して劇的に低いことが明らかとなった。遺伝子の核移行量を解析した結果、低温時に取り込まれた遺伝子封入リポソームは、常温で取り込まれたものと比較して、速度も効率も非常に低いことが明らかとなった。⁵⁾ 一般に、細胞質内の高分子の拡散は極めて低いことが示されており、核移行を考えるに当たり、生体の持つエネルギー依存的なベシクル輸送系にベクターを乗せることが、効率的に遺伝子を核まで輸送する上で有用な手段であることが示唆される。以上の知見より、細胞内取り込み経路は、その後の細胞内運命と大きく係わることが明らかとなった。⁶⁾

また、そのほかにも、Simian virus 40 (SV40)⁷⁾ など、カベオラによって取り込まれることが示唆されていることから、この分子機構を明らかとすることで、カベオラ依存的取り込み経路も遺伝子デリバリーのターゲットとなるであろう。

3. エンドソーム脱出過程

上記のように、細胞への選択性をベクターに付加するためには、レセプターを介したエンドサイトーシス経路をターゲットとすることは極めて有効であるが、この経路をターゲットとする以上、エンドソームのリソソームとの融合による遺伝子の分解や、細胞外へのリサイクルは克服すべき問題である。これらを克服するデバイスとして、(A) pH 感受性膜融合性脂質、(B) プロトンスポンジ効果を持つポリカチオン、(C) pH 感受性膜融合性ペプチドなど、多くの素子が開発されてきた。

(A) に関しては、Dioleoylphosphatidyl ethanolamine (DOPE) がカチオン性リポソームを用いた

遺伝子導入のヘルパー脂質としてよく用いられ、pH 7 では安定な膜構造を保つものの、エンドサイトーシスによって取り込まれたのちの pH 5—6 の環境下においては、ヘキサゴナル II 相構造を取り、エンドソーム膜と融合することが知られている。⁸⁾ (B) に関してはまた、Behr らによって有用性が証明されたポリエチレンイミンが有名である。このプロトンスポンジ仮説に従えば、プラスミド DNA と PEI のコンプレックスは、エンドソーム内の酸性状況下において、その構造内にある二級アミンがエンドソーム内のプロトンを緩衝し、その結果、過剰のプロトンと塩素イオンがエンドソーム内に引き込まれ、浸透圧に従って水分子が流入することで膜構造が破壊される。⁹⁾ このような人工的デバイスに加え、ウイルスのエンドソーム脱出機能を模倣した戦略が近年クローズアップされている。インフルエンザウイルスは、エンベロープ型ウイルスの 1 つであるが、エンドサイトーシスで取り込まれたのち、エンベロープ上に存在する hemagglutinin (HA) 2 タンパクが弱酸性条件下で非可逆的な α ヘリックス構造を取り、疎水部がエンドソームと相互作用したのちに膜融合を誘導する。¹⁰⁾ この機構を利用して、Wagner らは、HA2 タンパクの機能ドメインである N 末の配列を基にした配列をトランスフェリン/ポリカチオン体を主体とした遺伝子ベクターに修飾することにより、遺伝子発現の上昇に成功している。¹¹⁾ さらに、このようなウイルスのエンドソーム脱出機構に啓発され、酸性条件下で α -helix などの構造変化を起こすことが可能な人工的ペプチドデバイスが開発されてきた。その 1 つとして、GALA が挙げられる。GALA は、その名の通り、グルタミン酸、アラニン、ロイシン、アラニンの繰り返し配列を有するペプチドであり、pH 7.4 ではランダムコイル型であるが、酸性条件下でグルタミン酸の電荷が中和され、 α ヘリックス構造を取り、膜中で 8—12 個からなるポアを形成することが知られている。¹²⁾ われわれはこのペプチドのコレステロール誘導体を作製し、リポソーム脂質表面にトランスフェリンとともに GALA を提示させることにより、トランスフェリンレセプターによりエンドサイトーシスされたのち、リポソーム内封物を細胞質内に効率的に放出することが可能であることを証明した。¹³⁾ この技術は、今後遺伝子デリバリーのみ

留まらず、薬物の細胞内デリバリーを行う上で非常に有効であると考えられる。

4. 核移行過程

エンドソーム脱出ののち、遺伝子が最終的に機能するためには、核膜を突破し、その最終的な転写部位である核へ移行する必要がある。遺伝子の核膜突破の重要性を最も明確に示す報告としては、Polardによって行われた、遺伝子のマイクロインジェクションが挙げられよう。¹⁴⁾ LacZ をコードする遺伝子を細胞質と核内にマイクロインジェクションし、インジェクションしたうちの遺伝子発現を示した細胞数の割合を評価した結果、同コピー数をインジェクションした場合、核内インジェクションした方が非常に高い遺伝子発現効率を示し、また、同レベルの遺伝子発現を示すために必要なコピー数は、核内インジェクションをした際に比べて細胞質内インジェクションをした場合では、100—1000 倍必要であった。このことは、細胞質にインジェクションしたうちの1%以下しか、核に移行しないことを明確に示したデータである。また、様々なベクターにおいて、核膜の消失する細胞分裂時に遺伝子発現が亢進するという報告があることから、核膜が大きなバリアであることがうかがえる。^{15—17)} 特に生体内の大部分は非増殖細胞であることから、核膜突破御成功は、遺伝子デリバリーの適応範囲を劇的に拡大し、大きなブレイクスルーとなると期待される。

生体内においては、核と細胞質間の物質輸送は、すべて核膜孔を介して行われている。核膜孔は多くのタンパクの複合体であり、2枚膜から形成される核膜を貫通した構造をしている。核膜孔を自由に受動拡散できる物質サイズは、—9 nm (40—90 kDa 相当) であると言われており、それより大きなタンパクは核移行シグナル (Nuclear localization signal: NLS) 依存的に能動的に輸送されると考えている。¹⁸⁾ 最も典型的な例としては、SV40 ラージ T 抗原由来 NLS が有名であるが、本分子内の NLS 配列が約 60 kDa のレセプターである importin α によって認識され、さらにその N 末領域が importin β によって認識され、NLS/importin α /importin β の複合体 (nuclear pore complex) を形成し、細胞質から核へ核膜孔を介して輸送される。この過程においては、核膜孔は 39 nm 程度の分子まで透過させることができると考えられている。

遺伝子の場合、実際、どの程度のサイズまで核移行することが可能なのであろうか？ Wolff らは直線型 DNA の核移行性を digitonin permeabilized cell を用いて評価を行っている。その結果、短い DNA (<200 bp) までは効率的に核内に入ることが示されたものの、遺伝子が長くなるにつれ効率が減少し、1.5 kbp より大きくなると核移行効率が観察されないという結果となった。^{19,20)} われわれの遺伝子治療に用いるプラスミド DNA は、小さいもので 3 kbp 程度であると考えられるが、その際の分子量は数百万にも及び、サイズのにも遺伝子の核膜を介した受動的な拡散は著しく制限されていると考えられる。

上記のようなタンパクの核膜透過過程に着目し、積極的に核膜透過を上昇させるアプローチとして、まず、プラスミド自身に NLS を結合させるアプローチがなされてきた。アルブミンに対して NLS ペプチドを化学的にクロスリンクさせると、アルブミンの核内移行の上昇が認められたことから、²¹⁾ このような遺伝子の NLS 修飾は非常に合理的なアプローチであろうと考えられた。Behr らのグループは、直線型約 3.3 kbp のプラスミドの末端に対し、NLS を共有結合させることにより、10 倍から数 100 倍に遺伝子発現が上昇することを示している。²²⁾ しかし、同様な構造を有する NLS 修飾遺伝子、あるいは、さらに末端の NLS 数を増やした遺伝子を細胞質にマイクロインジェクションしても、その遺伝子発現効率は非修飾に比較して有意に上昇しないことから、核移行には数個の NLS 分子では不十分であろうと考えられている。^{23,24)} この大きな要因として、NLS 配列は一般に非常にカチオン性に富んでおり、遺伝子の持つ負電荷と静電的に相互作用してしまうために importin α による認識が抑えられてしまうことが挙げられる。Wolff らは、遺伝子に対し、NLS をランダムに共有結合させた結果、核移行が上昇することを報告しているが、その移行には多くの NLS の結合が重要であり、遺伝子としての機能が失われる程の数 (10 bp につき 1 個の NLS) が必要であることを示している。²⁵⁾ 合成の収率の低さも問題となり、現在では遺伝子に NLS を共有結合させるアプローチは主流とはなっていない。

また、NLS を遺伝子に直接化学結合する方法のほかにも、NLS を様々な媒体を介して、核膜透過

の促進を成功させた例も報告されている。Wolffらは、直線型 DNA の末端にビオチンラベルを行い、ビオチンを介して NLS 結合 streptavidin とコンプレックスを形成させることにより、1 kbp までのサイズの遺伝子を非常に効率的に核膜に送達し、レポーター遺伝子としての green fluorescence protein (GFP) の発現効率を上昇させることに成功している。²⁰⁾ このように、NLS を直接 DNA に結合させるのではなく、タンパクを介して NLS を結合させ、NLS と DNA 間の静電的相互作用を回避した形で提示できれば、核移行性は得られる可能性がある。一方、上記の理由から、プラスミドに修飾する核移行性素子として、NLS 配列以外のカチオン性の低いものを用いるという方法も挙げられる。これまで、peptide nucleic acid (PNA) を介してステロイドを修飾することにより、細胞質内のステロイドレセプターにより認識させ、本転写因子の核内移行とともに核移行を促進させるアプローチ²⁶⁾や、ビオチン/アビジン結合を介して importin β タンパク自身を修飾する方法²⁷⁾が報告され、いずれも遺伝子発現の上昇が認められている。

第2のアプローチとして、核移行性を有する転写因子が結合する遺伝子配列をプラスミドに挿入することにより、naked DNA 自身の遺伝子発現亢進を狙ったアプローチも報告されている。この概念で最も研究されているものの1つに、SV40 由来のエンハンサーが挙げられる。²⁸⁻³²⁾ 本配列中には、AP-1、AP-2、NF- κ B などの基礎転写因子の結合領域が多数存在しており、プラスミド DNA が細胞質で転写因子に認識されれば、転写因子内の核移行シグナルによって核内に輸送されるという戦略である。細胞質マイクロインジェクションや digitoin permeabilized cell を用いたアッセイ法により、遺伝子の核移行性の上昇が示唆されている。また、平滑筋特異的に発現する Smooth muscle gamma-actin (SMGA) のプロモーターを持つプラスミド DNA は、平滑筋細胞特異的に遺伝子の核移行促進が認められることが示唆されている。³⁰⁾ このことより平滑筋特異的な転写因子に認識され、プラスミド DNA が核移行を示したと考えられる。このほかにも、NF- κ B の認識配列^{33,34)} や Epstein-Barr Virus 由来の ori P 配列³⁵⁾ をプラスミド内に導入することで遺伝子発現が上昇するなどの報告もあり、細胞内炎症シグナル依

存的あるいは、ウイルス感染細胞依存的な核移行性制御など、環境応答的な核移行戦略と考えられる。

一方で、これまで挙げた戦略のデメリットとして、細胞質内において DNA は裸の状態で存在することが挙げられる。細胞内のプラスミド DNA の半減期は 50—90 分であることが示されており、³⁶⁾ このような裸の DNA は核移行をする前に、細胞質内のヌクレアーゼによりダメージを受ける可能性が挙げられる。遺伝子の細胞内安定性を高める方法として、遺伝子をポリカチオンと凝集する方法が挙げられる。³⁷⁾ また、上記のように、遺伝子への NLS の直接修飾は、NLS と遺伝子間の静電的相互作用により NLS 機能が発揮できないことを議論したが、ポリカチオンと DNA をコンパクションすることにより、遺伝子の持つ負電荷を中和することができ、より NLS の機能が発揮されることが期待される。

遺伝子デリバリーに昔からよく用いられていたポリカチオンとして、poly L-lysine (PLL) が挙げられる。Jans らのグループは PLL に NLS を結合させ、DNA のコンパクションを行った。³⁸⁾ 本コンパクション体を用いて、塩化カルシウム法やリポフェクション法によってトランスフェクションが試みられたが、その遺伝子発現の上昇は 2 倍にも満たない。³⁸⁾ NLS も PLL 同様、高いカチオン性を有するため、NLS がコンパクションに消費され、importin タンパクに認識されなかったことが大きな要因と考えられ、NLS のトポロジーをいかにコントロールするかが鍵を握ると考えられる。一方、Diamond らは、グリシンに富み、カチオン性の比較的小さい核移行性シグナルである M9 ペプチドに着目し、ポリカチオン（ランダム化した SV40 由来 NLS 配列：ScT）とクロスリンクを行った。本 M9-ScT ペプチドと遺伝子複合体をリポフェクションすることにより、プラスミド DNA 単独に比べ、63 倍程度の劇的な遺伝子発現の上昇が認められている。³⁹⁾ さらに最近では、アルギニンに富み、核移行性も示唆されている、TAT タンパク由来 Protein Transduction Domain (PTD) のオリゴマー⁴⁰⁾ とプラスミド DNA の複合体を形成させることにより、カチオン性リポソームやデンドリマーによるトランスフェクション活性が 10—100 倍常用することが示されている。また、SV40 NLS の tetramer⁴¹⁾ や核

特異的ペプチドであるプロタミン^{42,43}との DNA のコンパクション体やアデノウイルスのコアペプチドである mu とプラスミド DNA 複合体を脂質でパッケージングした LMD パーティクル⁴⁴は、PLL とのコンパクション、あるいはコンパクションをしない遺伝子/脂質複合体に対し、非常に高い遺伝子発現を示すことが報告されている。mu やプロタミンの高い核移行性については、われわれもマイクロインジェクションによって確認済みである。^{43,45} このような、核移行性ペプチドとのコンパクション体も有用な戦略の 1 つであると言えよう。

また、NLS 以外の素子として、糖の利用も有用であると考えられる。1993 年に初めてグルコース修飾 BSA が核に集積するという結果が得られてから、⁴⁶ ある種の糖も核レクチンによって認識され、核へ移行することが明らかとなってきた。特にラクトースについては、PLL に修飾した際、ほかの糖を修飾した場合よりも細胞への取り込みは低いものの、遺伝子発現は高いという結果が得られており、糖が細胞内動態過程に影響を及ぼし得ること⁴⁷や、実際の共焦点レーザー顕微鏡画像においても、遺伝子の高い核への集積が認められていることから、⁴⁸ 核移行性素子としての有用性がクローズアップされている。

われわれは近年、さらに強力な核移行性デバイスを構築すべく、NLS と遺伝子の独立配置をねらったトポロジーコントロールを行っている。NLS をポリカチオンに修飾し、遺伝子と凝縮を行う方法では、NLS のパーティクル表面提示が凝縮化状態に大きく依存するため、コントロールが困難となる。そこで、NLS の脂質誘導体を作製し、遺伝子/プラスミドコアを、核移行性を有する脂質によってコーティングを行った。⁴⁹ このような構造を取ることにより、NLS の表面提示を積極的に行うことが可能となると同時に、構成脂質の NLS 修飾脂質の割合を変えるだけで修飾密度が容易に制御可能となる。このような核移行性戦略は、アデノウイルスにおいてもみられる。本ウイルスにおいては、DNA が外殻タンパクに由来する NLS の機能により核膜孔の CAN/Nup214 に結合し、核膜上で崩壊して DNA を核内に到達させることが明らかとなっている。このような独立配置型ベクターを用いることにより、非分裂細胞である樹状細胞に対して高い遺伝子発現

を示すことが明らかとなった。このように、核移行性戦略の歴史は、核移行性素子のトポロジー変化とともに変遷してきたと言えよう。

5. 細胞内動態に基づいた遺伝子ベクター開発

以上、細胞内動態を制御するための様々な試みを紹介してきた。しかし、これらのもののほとんどは、個々のプロセス単独の改良に留まっており、個々のプロセスの素子を組み合わせるといった応用面に関してはまだ発展途上の段階である。今後の遺伝子デリバリー素子開発においては、それぞれの機能が最適に機能するよう、遺伝子ベクターに組み込むことが非常に重要である。しかし、その最適化を行う上では、個々の素子が細胞内でどの程度機能しているか、その定量的な評価とその結果に基づくフィードバックが必要である。

しかし、これまでの遺伝子開発段階においては、そのほとんどのものが最終的なアウトプット、すなわち、遺伝子発現のみを指標にしたものであり、実際の細胞内動態はブラックボックスのままであった。この意味で、これまでの開発は試行錯誤的であったと言えよう。われわれは、ウイルスベクターに匹敵する人工ベクターをいち早く完成させるために、Fig. 2 に示すような戦略を提案している。究極的な比較として、目標となるウイルスベクターと現状の人工ベクターの細胞内動態を比較し、「どこが」「どれだけ」「なぜ」劣っているのかという、弱点と原因を明らかにした上で、克服する素子を開発し、搭載するという戦略である。もし、発現がまだ不十分であれば、さらに細胞内動態を再評価し、弱点を洗い出すことが可能である。このようなフィードバックループは、人工ベクター改良の有用な手段になると考えられる。しかしながら、これまで、遺伝子の細胞内動態を定量化する方法論自体が存在しなかったため、このような戦略は取ることが困難であった。これまで橋らは、定量的な知見を得るために、核分離と PCR を用いた、遺伝子の核内遺伝子量の測定に着手してきた。⁵⁰ しかし、この方法をエンドソーム/ライソソーム系に応用すると、分画プロトコル自身や収率や分画精度の計算の複雑さより、非常に手間の掛かる方法である。この問題を解決すべく、われわれは共焦点レーザー顕微鏡を用いた、エンドソーム/リソソーム、細胞質、核内の遺伝子量を同時に測定する方法論を開発した。⁵¹ 遺伝子は

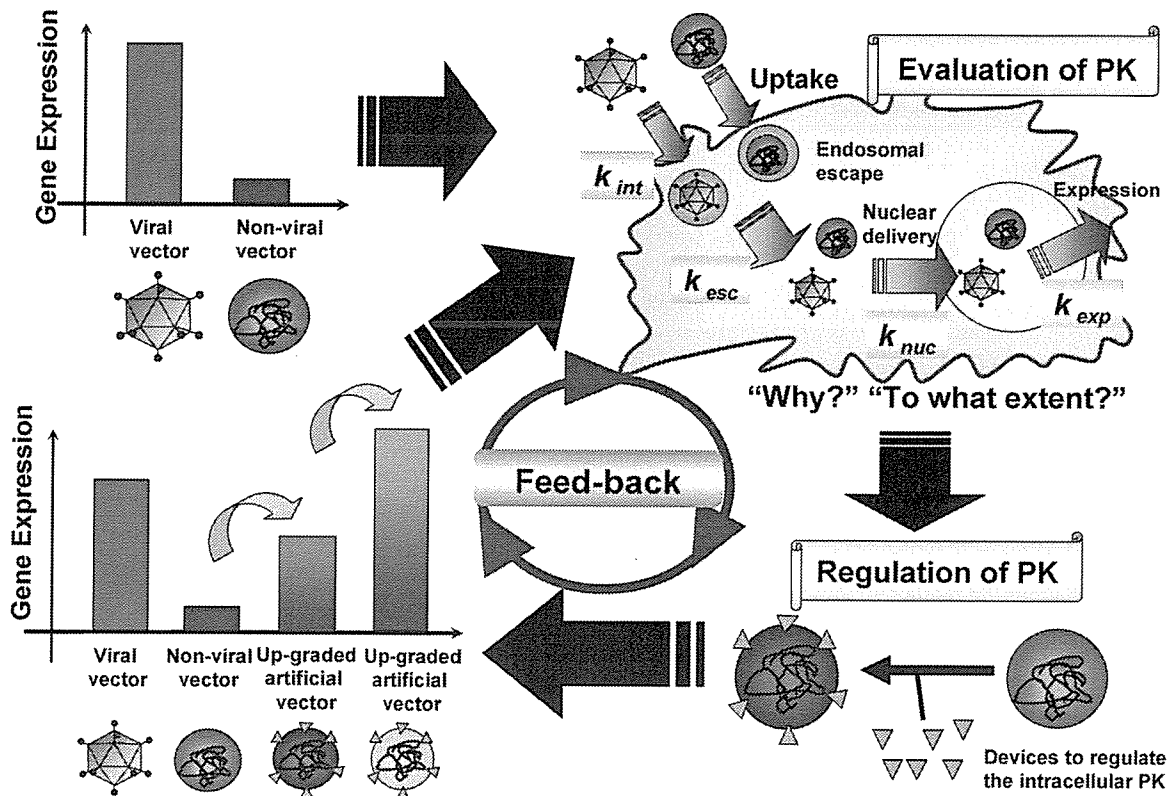


Fig. 2. Development of Non-viral Vectors Based on the Quantitative Comparison of Intracellular Trafficking with Viral Vector

For the efficient development of non-viral vector, it is useful to identify 'Why' and 'To What Extent' current non-viral vectors are inferior to the viral one from the point of view of intracellular trafficking.

細胞に導入後、数時間の間はクラスターとして検出されることが明らかとなっている。本方法はこの現象を利用し、エンドソーム/リソソーム、及び核などのオルガネラの染め分けをしてローダミンラベルした遺伝子の局在を明らかにした上で、遺伝子のクラスター面積を遺伝子量の指標として3次元的に定量する方法である (Fig. 3: Confocal Image-assisted 3-Dimensionally Integrated Quantification: CIDIQ).⁵¹⁾

そこで、本評価系を用いて、ウイルスベクターと人工ベクター間の比較を行った。⁵²⁾ 本研究では、ウイルスベクターの代表として様々な細胞種に対し、最強の遺伝子発現を誇るアデノウイルスを、また、人工ベクターの代表として、先に挙げたように非常に効率的な遺伝子発現を示す、LipofectAMINE PLUS を用い、比較検討を行った。なお、本研究で用いているプロモーター、polyA 付加シグナルなどの配列は、プラスミド DNA とアデノウイルスで共通のものを用いている。まず始めに両ベクターによる遺伝子発現のプロファイルについて検討した。最

適化された LipofectAMINE PLUS 及びアデノウイルスのプロトコールに従いトランスフェクションしたところ、両ベクターともトランスフェクション後、3時間で遺伝子発現が認められ (Fig. 4(A)), 以後の両ベクターの発現活性はほぼ同じであることが明らかとなった。このことから、LipofectAMINE PLUS は、アデノウイルスと同等のスピードで核まで遺伝子を送達することや Ad に匹敵する発現活性を有することが示唆された。一方、リアルタイム PCR により DOSE をルシフェラーゼ遺伝子のコピー数として表記して比較した結果、同程度の活性を示すのに必要なコピー数は、LipofectAMINE PLUS においてアデノウイルスと比較して数千から1万倍多いことが示された (Fig. 4(B)). *In vivo* への応用などを考えると、投与量を最小にするためには、単位コピー当たりの発現活性を上昇させる必要があり、細胞内のどの過程にこの要因があるのかを明らかにすることは有用である。

始めに、LipofectAMINE PLUS とアデノウイルスの細胞への取り込み過程を比較した。アデノウイ

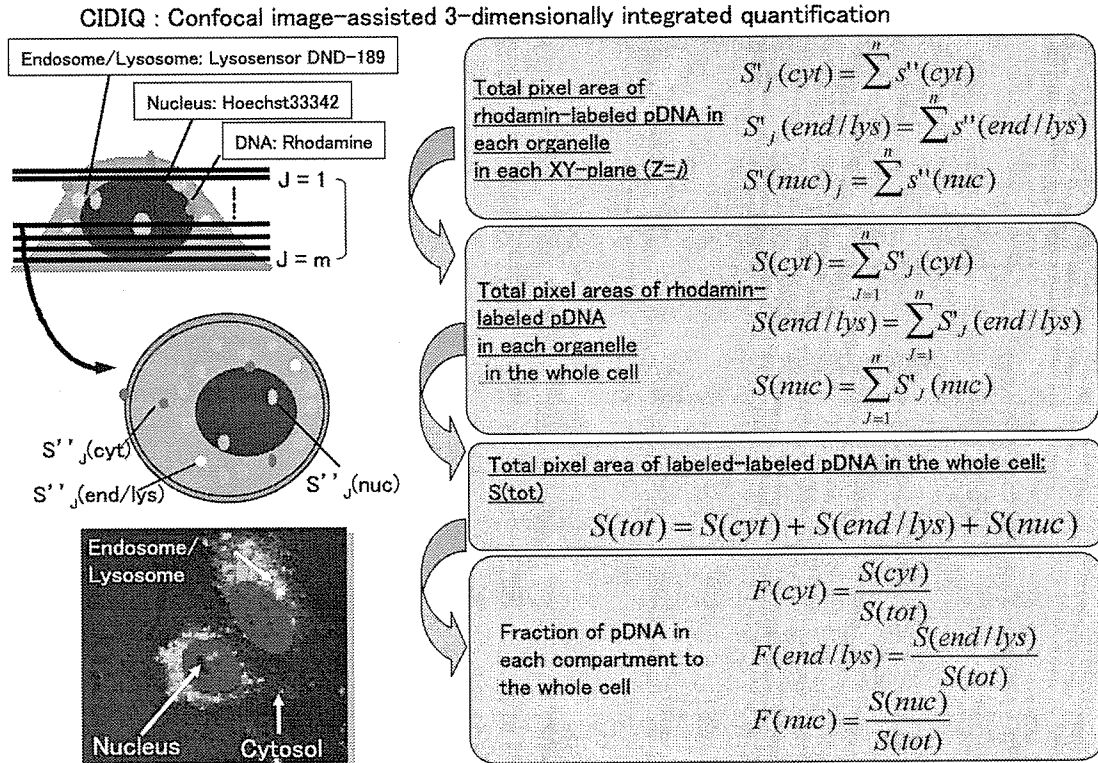


Fig. 3. Methodology to Quantify the Intracellular Trafficking of Gene Vectors Based on the Confocal Images
 After the transfection of rhodamine-labeled genes, acidic compartment (e.g. endosome/lysosome) and nucleus was stained by Lysosensor and Hoechst 33342, respectively. Z-series of confocal images were captured by confocal laser scanning microscopy. The pixel areas of cluster was used as a index of the amount of pDNA.

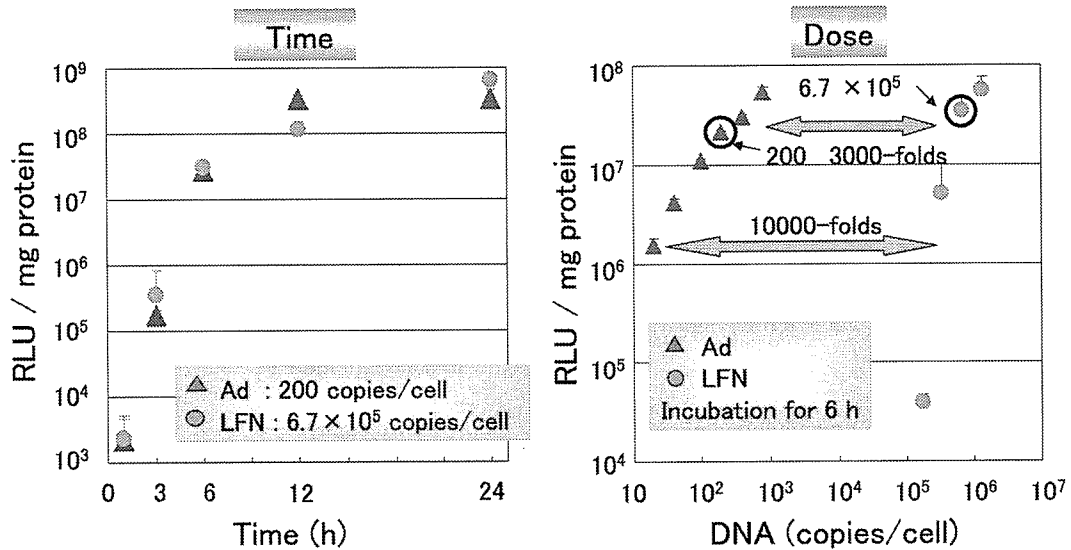


Fig. 4. Comparison of Transgene Expression between Adenovirus and Lipfect AMINE PLUS
 A: Transfection activities were measured at indicated times after incubation with an optimized dose of 200 copies/cell (adenovirus) and 6.7×10^5 copies/cell (LipfectAMINE PLUS). B: Luciferase gene expression transfected by Ad (triangle) or LFN (circle) were measured 6 h after incubation at the indicated dose.

ルス又は LipfectAMINE PLUS をトランスフェクション後、37°Cで1hインキュベートし、細胞を回収した。DNAを抽出し、real time PCRにより定量し、細胞数はβ-actinのゲノム量を基に決定し

た。37°Cインキュベート時の取り込み効率は、LipfectAMINE PLUSでDoseの45%、アデノウイルスでDoseの10%と、LipfectAMINE PLUSの方が効率的であり、コピー数で約1万倍多くの

DNA が取り込まれることが明らかとなった。

続いて、細胞内動態について解析した。先に示したように、CIDIQ 法により各オルガネラに存在する遺伝子の割合を測定することが可能である。リアルタイム PCR によって求まる細胞へ取り込まれた遺伝子コピー数の絶対値にこれらの細胞内局在割合を掛けることにより、オルガネラ内遺伝子量を算出することが可能である。アデノウイルスについても、CIDIQ を利用してアデノウイルスの各オルガネラへの局在を解析した。アデノウイルスにおいては、ゲノムそのものをラベルすることは不可能である。本定量においては、アデノウイルスの外殻タンパク質であるヘキソンを Texas Red によりラベルした。その結果、LipofectAMINE PLUS と同様、エンドソーム・ライソソームに局在するときは黄色、細胞質に局在するときは赤色に観察された。一方、核内にも赤のシグナルの共局在は認められたが、アデノウイルスは核移行の際、核膜孔上で崩壊し、アデノウイルスのゲノムが外殻タンパクと解離することから、これら核内のシグナルは核中のアデノウイルスのゲノム量を反映していないと考えられる。そこで、アデノウイルスゲノムの核内移行量の算出については核単離を行い、リアルタイム PCR によって定量を行った。常法に従い核単離を行い、遺伝子量を定量した結果、1 細胞当たり取り込まれたアデノウイルスの約 36.6% に相当する 7.3 コピーが核に存在していることが明らかとなった。Figure 5 には、CIDIQ 及びリアルタイム PCR より得られた両ベクターの細胞内オルガネラへの局在率並びに遺伝子量

について示している。トランスフェクション後 1 時間でアデノウイルスは LipofectAMINE PLUS よりも多く核に分布していることが明らかとなったが、その効率は数倍程度であり、細胞内動態の違いからは、大きな遺伝子発現効率の差は説明することは不可能である。

最後に、核移行量について比較を行った。核内に存在する遺伝子量は、LipofectAMINE PLUS で数千倍高く、同程度の遺伝子発現を示すのに、LipofectAMINE PLUS の方が桁違いに多くのコピー数が必要であることが示された。言い換えれば、1 コピー当たりの核移行後の遺伝子発現効率は、アデノウイルスの方が LipofectAMINE PLUS よりも格段に高いことを示す結果であり、その差は約 8000 倍異なることが明らかとなった。したがって、LipofectAMINE PLUS とアデノウイルスによる発現効率の差の支配要因は、主に、核移行後の発現効率にあることが明らかとなった。⁵²⁾

以上、本研究により細胞内動態はもちろんのこと、新たな課題として、核内動態過程にも注目する必要性が明らかとなった。もちろん、本研究は細胞内動態の重要性を否定するものではない。細胞内動態と核内動態過程は直列でつながっており、どこのプロセスで止まっても、遺伝子の発現は望めない。本結果は、細胞内動態を制御した上で、さらに核内動態も制御する必要があるという重要な結果を示すものである。今後、核内動態のイメージング方法の確立を急ぐとともに、本情報をフィードバックすることで優れたベクターの構築を目指すことが重要で

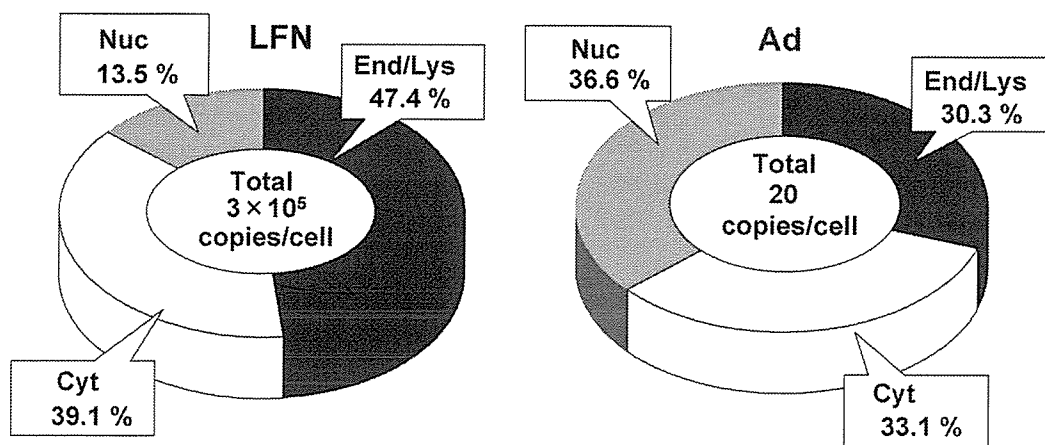


Fig. 5. Comparison Intracellular Distribution between Adenovirus and Lipofect AMINE PLUS
Intracellular distribution of adenovirus and LipofectAMINE PLUS at 1 hour after the transfection.

あると考えている。

6. おわりに

以上、遺伝子デリバリーの障害となる過程について、その克服へのトライアルも含めて概説した。各過程に対して、非常に優れた素子は開発されつつあるが、今後はそれぞれの素子をいかに最適に1つのベクターに組み込むことができるかが重要な課題となろう。われわれのベースとなる多機能性エンベロープ型ナノ構造体^{37,53)}は、このような Packaging 戦略を実現するための1つのナノ構造体であり、ウイルスベクターに匹敵するベクター開発を目指して研究を行っている。

REFERENCES

- 1) Mizuguchi H., Koizumi N., Hosono T., Ishii-Watabe A., Uchida E., Utoguchi N., Watanabe Y., Hayakawa T., *Gene Ther.*, **9**, 769–776 (2002).
- 2) Li E., Stupack D., Klemke R., Cheresch D. A., Nemerow G. R., *J. Virol.*, **72**, 2055–2061 (1998).
- 3) Meier O., Boucke K., Hammer S. V., Keller S., Stidwill R. P., Hemmi S., Greber U. F., *J. Cell Biol.*, **158**, 1119–1131 (2002).
- 4) Khalil I. A., Kogure K., Futaki S., Harashima H., *J. Biol. Chem.*, **281**, 3544–3551 (2006).
- 5) Iwasa A., Akita H., Khalil I. A., Kogure K., Futaki S., Harashima H., *Biochim. Biophys. Acta* (in press).
- 6) Khalil I. A., Kogure K., Akita H., Harashima H., *Pharmacol. Rev.*, **58**, 32–45 (2006).
- 7) Norkin L. C., Anderson H. A., Wolfrom S. A., Oppenheim A., *J. Virol.*, **76**, 5156–5166 (2002).
- 8) Xu Y., Szoka Jr. F. C., *Biochemistry*, **35**, 5616–5623 (1996).
- 9) Boussif O., Lezoualc'h F., Zanta M. A., Mergny M. D., Scherman D., Demeneix B., Behr J. P., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **92**, 7297–7301 (1995).
- 10) Dutch R. E., Jardetzky T. S., Lamb R. A., *Biosci. Rep.*, **20**, 597–612 (2000).
- 11) Plank C., Oberhauser B., Mechtler K., Koch C., Wagner E., *J. Biol. Chem.*, **269**, 12918–12924 (1994).
- 12) Parente R. A., Nir S., Szoka Jr. F. C., *Biochemistry*, **29**, 8720–8728 (1990).
- 13) Kakudo T., Chaki S., Futaki S., Nakase I., Akaji K., Kawakami T., Maruyama K., Kamiya H., Harashima H., *Biochemistry*, **43**, 5618–5628 (2004).
- 14) Pollard H., Remy J. S., Loussouarn G., Demolombe S., Behr J. P., Escande D., *J. Biol. Chem.*, **273**, 7507–7511 (1998).
- 15) Escriou V., Carriere M., Bussone F., Wils P., Scherman D., *J. Gene Med.*, **3**, 179–187 (2001).
- 16) Mortimer I., Tam P., MacLachlan I., Graham R. W., Saravolac E. G., Joshi P. B., *Gene Ther.*, **6**, 403–411 (1999).
- 17) Tseng W. C., Haselton F. R., Giorgio T. D., *Biochim. Biophys. Acta*, **1445**, 53–64 (1999).
- 18) Allen T. D., Cronshaw J. M., Bagley S., Kiseleva E., Goldberg M. W., *J. Cell Sci.*, **113** (Pt 10), 1651–1659 (2000).
- 19) Hagstrom J. E., Ludtke J. J., Bassik M. C., Sebestyen M. G., Adam S. A., Wolff J. A., *J. Cell Sci.*, **110** (Pt 18), 2323–2331 (1997).
- 20) Ludtke J. J., Zhang G., Sebestyen M. G., Wolff J. A., *J. Cell Sci.*, **112** (Pt 12), 2033–2041 (1999).
- 21) Tachibana R., Harashima H., Shono M., Azumano M., Niwa M., Futaki S., Kiwada H., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **251**, 538–544 (1998).
- 22) Zanta M. A., Belguise-Valladier P., Behr J. P., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **96**, 91–96 (1999).
- 23) Nagasaki T., Myohoji T., Tachibana T., Futaki S., Tamagaki S., *Bioconjug. Chem.*, **14**, 282–286 (2003).
- 24) Tanimoto M., Kamiya H., Minakawa N., Matsuda A., Harashima H., *Bioconjug. Chem.*, **14**, 1197–1202 (2003).
- 25) Sebestyen M. G., Ludtke J. J., Bassik M. C., Zhang G., Budker V., Lukhtanov E. A., Hagstrom J. E., Wolff J. A., *Nat. Biotechnol.*, **16**, 80–85 (1998).
- 26) Rebuffat A., Bernasconi A., Ceppi M., Wehrli H., Verca S. B., Ibrahim M., Frey B. M., Frey F. J., Rusconi S., *Nat. Biotechnol.*, **19**, 1155–1161 (2001).
- 27) Nagasaki T., Kawazu T., Tachibana T., Tamagaki S., Shinkai S., *J. Control Release*, **103**, 199–207 (2005).
- 28) Dean D. A., *Exp. Cell Res.*, **230**, 293–302

- (1997).
- 29) Dean D. A., Dean B. S., Muller S., Smith L. C., *Exp. Cell Res.*, **253**, 713–722 (1999).
 - 30) Vacik J., Dean B. S., Zimmer W. E., Dean D. A., *Gene Ther.*, **6**, 1006–1014 (1999).
 - 31) Wilson G. L., Dean B. S., Wang G., Dean D. A., *J. Biol. Chem.*, **274**, 22025–22032 (1999).
 - 32) Young J. L., Benoit J. N., Dean D. A., *Gene Ther.*, **10**, 1465–1470 (2003).
 - 33) Mesika A., Grigoreva I., Zohar M., Reich Z., *Mol. Ther.*, **3**, 653–657 (2001).
 - 34) Mesika A., Kiss V., Brumfeld V., Ghosh G., Reich Z., *Hum. Gene Ther.*, **16**, 200–208 (2005).
 - 35) Langle-Rouault F., Patzel V., Benavente A., Tailleux M., Silvestre N., Bompard A., Sczakiel G., Jacobs E., Rittner K., *J. Virol.*, **72**, 6181–6185 (1998).
 - 36) Lechardeur D., Sohn K. J., Haardt M., Joshi P. B., Monck M., Graham R. W., Beatty B., Squire J., O’Brodivich H., Lukacs G. L., *Gene Ther.*, **6**, 482–497 (1999).
 - 37) Kogure K., Moriguchi R., Sasaki K., Ueno M., Futaki S., Harashima H., *J. Control Release*, **98**, 317–323 (2004).
 - 38) Chan C. K., Jans D. A., *Hum. Gene Ther.*, **10**, 1695–1702 (1999).
 - 39) Subramanian A., Ranganathan P., Diamond S. L., *Nat. Biotechnol.*, **17**, 873–877 (1999).
 - 40) Rudolph C., Plank C., Lausier J., Schillinger U., Muller R. H., Rosenecker J., *J. Biol. Chem.*, **278**, 11411–11418 (2003).
 - 41) Ritter W., Plank C., Lausier J., Rudolph C., Zink D., Reinhardt D., Rosenecker J., *J. Mol. Med.*, **81**, 708–717 (2003).
 - 42) Masuda T., Akita H., Harashima H., *FEBS Lett.*, **579**, 2143–2148 (2005).
 - 43) Sorgi F. L., Bhattacharya S., Huang L., *Gene Ther.*, **4**, 961–968 (1997).
 - 44) Keller M., Harbottle R. P., Perouzel E., Colin M., Shah I., Rahim A., Vaysse L., Bergau A., Moritz S., Brahimi-Horn C., Coutelle C., Miller A. D., *Chembiochem.*, **4**, 286–298 (2003).
 - 45) Akita H., Tanimoto M., Masuda T., Kogure K., Hama S., Ninomiya K., Futaki S., Harashima H., *J. Gene Med.*, **8**, 198–206 (2006).
 - 46) Duverger E., Carpentier V., Roche A. C., Monsigny M., *Exp. Cell Res.*, **207**, 197–201 (1993).
 - 47) Fajac I., Briand P., Monsigny M., Midoux P., *Hum. Gene Ther.*, **10**, 395–406 (1999).
 - 48) Klink D. T., Chao S., Glick M. C., Scanlin T. F., *Mol. Ther.*, **3**, 831–841 (2001).
 - 49) Nakamura T., Moriguchi R., Kogure K., Minoura A., Masuda T., Akita H., Kato K., Hamada H., Ueno M., Futaki S., Harashima H., *Biol. Pharm. Bull.*, **29**, 1290–1293 (2006).
 - 50) Tachibana R., Harashima H., Shinohara Y., Kiwada H., *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **52**, 219–226 (2001).
 - 51) Akita H., Ito R., Khalil I. A., Futaki S., Harashima H., *Mol. Ther.*, **9**, 443–451 (2004).
 - 52) Hama S., Akita H., Ito R., Mizuguchi H., Hayakawa T., Harashima H., *Mol. Ther.*, **13**, 786–794 (2006).
 - 53) Kamiya H., Akita H., Harashima H., *Drug Discov. Today*, **8**, 990–996 (2003).

新しいアデノウイルスベクターの開発

櫻井文教



水口裕之



現在、臨床応用研究を含め一般に汎用されているアデノウイルス(Ad)ベクターは Subgroup C に属する 5 型 Ad を基盤としている。しかしながら近年、研究の進展に伴い 5 型 Ad ベクターの様々な問題点が明らかとなってきた。それらの問題点を克服すべく、Subgroup B に属する Ad を基本骨格とした新規 Ad ベクターが開発されている。本稿では、Subgroup B Ad ベクターの遺伝子導入特性について紹介したい。

キーワード：アデノウイルスベクター、Subgroup、血清型、CD46、遺伝子治療

はじめに

アデノウイルス(Ad)は直鎖状約 35 ~ 36kb の二本鎖 DNA をゲノムに持つ非エンベロップウイルスである。形状としては直径約 80nm の正 20 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(ファイバーおよびペントンベース)と呼ばれる突起構造を持っている(図 1)。これまで Ad はチンパンジー、羊、マウスなど多くの動物から単離されているが、ヒト Ad に関しては 51 種類の血清型が同定されており(図 1)、結膜炎や咽頭炎などの原因ウイルスとなっている。これら 51 種類の血清型からなるヒト Ad は、その遺伝子配列や赤血球凝集効果の違いにより、A から F の 6 つの Subgroup に分類されており、一般に汎用されている Ad ベクターは Subgroup C に属する 5 型 Ad (もしくは 2 型) を基本骨格としている。5 型 Ad ベクターは遺伝子導入用ベクターとして優れた長所を数多く有しており、遺伝子治療臨床研究のみならず遺伝子機能解析などを目的とした基礎研究の場においても広く用いられている。しかしながら近年、研究の進展に伴い 5 型 Ad ベクターが抱える様々な問題

点明らかとなってきた。そこでこれらの問題点を克服すべく、筆者らのグループをはじめとする世界のいくつかのグループによって、Subgroup B に属する Ad を基本骨格とした新規 Ad ベクターが開発されている。

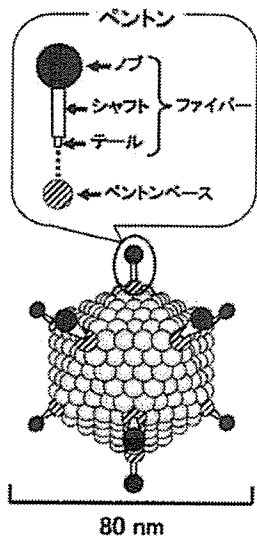
1. 5 型 Ad ベクターの抱える問題点

5 型 Ad ベクターは①既存の遺伝子導入用ベクターの中で最も高い遺伝子導入能を有する、②分裂・非分裂細胞ともに遺伝子導入可能である、③高タイターのウイルス粒子が回収可能である、④ *in vivo* にも適応可能である、⑤物理的に安定であるため遠心操作により濃縮が可能である、⑥比較的大きな外来遺伝子(最大 8.1kb)が搭載可能である、⑦導入遺伝子が細胞の染色体に組み込まれることがないため、遺伝子発現は一過性となる一方、遺伝子毒性(導入遺伝子が染色体に組み込まれることにより細胞ががん化する)を示す可能性が低い、などの長所を有し、全遺伝子治療臨床研究の約 25% で用いられている(2006 年 1 月現在)。しかし近年、以下のような問題点が明らかとなってきた。

① 受容体である Coxsachievirus and adenovirus

Development of adenovirus vectors composed of human subgroup B adenoviruses

筆者紹介：さくらい・ふみのり(SAKURAI, Fuminori) (独)医薬基盤研究所 遺伝子導入制御プロジェクト(Lab. of Gene Transfer and Regulation, Natl. Inst. of Biomedical Innovation) 研究員 2001 年京都大学大学院薬学研究科博士課程修了 博士(薬学) 専門：遺伝子治療学 連絡先：〒567-0085 大阪府茨木市彩都あさぎ 7-6-8 E-mail sakurai@nibio.go.jp (勤務先)
みずぐち・ひろゆき(MIZUGUCHI, Hiroyuki) 同上プロジェクトリーダー 1996 年大阪大学大学院薬学研究科博士課程修了 博士(薬学) 専門：遺伝子治療学 連絡先：同上 E-mail mizuguch@nibio.go.jp (勤務先)



サブグループ	血清型	受容体 ^{*)}
A	12, 18, 31	CAR
B	3, 7, 11, 14, 16, 21, 34, 35	CD46
C	1, 2, 5, 6	CAR
D	8, 9, 10, 13, 15, 17, 19, 20, 22-30, 32, 33, 36-38, 42-47	CAR
E	4	CAR
F	40, 41	CAR

CAR: coxsackievirus-adenovirus receptor
 *) 幾つかの血清型のAdでは例外が存在する。

図1 ヒトアデノウイルスの構造ならびに分類

receptor(CAR)の発現が低い細胞への遺伝子導入効率が低い。

5型Adのみならず、Subgroup Bに属するAdを除くほぼすべてのAdは、ファイバースタンプと呼ばれるファイバーの先端部分が第1受容体であるCARに結合することで細胞に感染する。CARはタイトジャンクション形成に関与する分子量約46kDaの膜タンパク質で、上皮細胞や肝細胞などで発現している。これらCAR陽性細胞には5型Adベクターにより高効率な遺伝子導入が可能であるが、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はじめとする血液細胞、血管平滑筋細胞、樹状細胞などがCAR陰性である。またがん細胞においては、がん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。

②すでに多くの成人が5型Adに対する抗体を有している。

5型Adは、臨床的には小児の風邪を引き起こすウイルスの一つであるが、Seshidharらの報告によると、成人の約50%はすでに5型Adに対する抗体を保持している²⁾。既存抗体は*in vivo* 遺伝子発現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³⁾。したがって、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、大きな副作用を引き起こす危険性がある。

2. Subgroup Bに属するAdの特徴

以上のような問題点を克服するため、Subgroup Bに属するAdを基本骨格とした新規Adベクターの開発が筆者らを含めたいくつかのグループで精力的に行われている。Subgroup Bには3、7、11、14、16、21、34、35、50型Adが属しているが、これらのうち3、7、11、35型Adがベクター化されている^{2),4)-7)}。中でも11、35型Adベクターについては、以下のような理由から最も研究が進んでいる。

①受容体としてCD46(membrane cofactor protein)を認識して細胞に感染する。

Subgroup Bに属するAdはCAR以外の分子を受容体として認識することは以前から知られていたが、その正体は長らく不明であった。しかしながら、2003年に補体制御因子であるCD46がSubgroup B Adの受容体であることが報告された⁸⁾。詳細は後述するが、CD46はヒトでは赤血球を除くほぼすべての細胞で発現していることから、Subgroup Bに属するAdベクターはCAR陰性細胞を含め広い感染域を持つ。

②Subgroup B Adに対する抗体保持率が低い。

5型Adに対する成人の抗体保持率は50%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⁹⁾。とくに11、35型Adに対する抗体保持率は20%以下と低いことから、11型および35型Adを基本骨格としたベクターについては既存抗体により遺伝子導入効率が減弱する可能性は低い。このような理由から、Subgroup B Ad、とくに11型および35型Adはベクターの基本骨格として極めて有望であると考えられる。

一方で、ファイバータンパク質だけをSubgroup B Ad由来のものに置換し、他の領域は従来の5型Adからなるファイバー置換型5型Adベクターも開発されている。Adはファイバースタンプ領域が受容体に結合することで感染することから、ファイバータンパク質を置換することで感染域を変えることができる。しかし

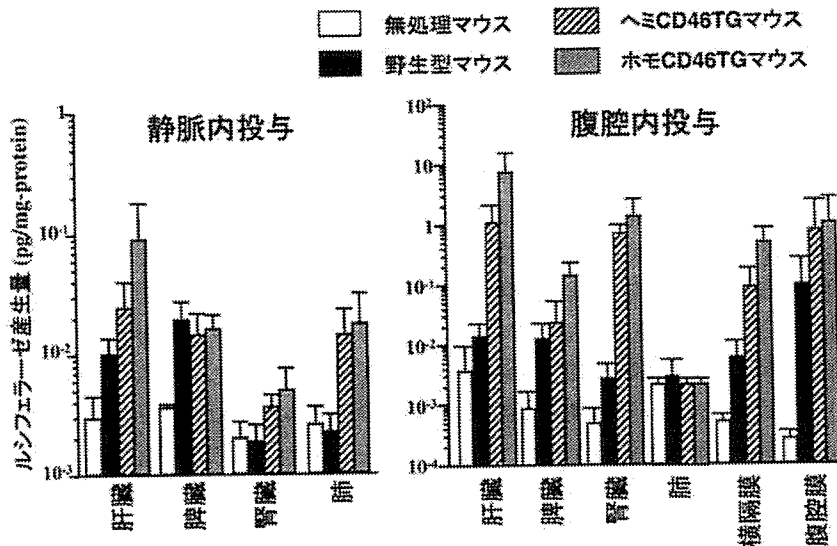


図4 ヒトCD46トランスジェニックマウスにおける35型アデノウイルスベクターの遺伝子発現効率

ホタルシフェラーゼ発現35型Adベクターを野生型およびCD46TGマウスに対し静脈内および腹腔内投与した。投与より48時間後、マウスより各臓器を回収し、ルシフェラーゼ活性を測定した。

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およ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と比較しそれぞれ約20000分の1、および50分の1であった。他のグループからの報告においてもCD46TGマウスを用いることで劇的な遺伝子発現量の増加は観察されていない。なぜ35型AdベクターがCD46TGマウスにおいても低い遺伝子発現しか示さないのか？については今後の検討課題であるが、CD46は主に細胞のBasolateral側で発現しているために¹⁴⁾、35型Adベクターが細胞外マトリックスやタイトジャンクションなどの立体障害により細胞間隙を通過できず、CD46に到達できないのかもしれない。また35型Adのヒト由来細胞への感染にはCD46以外の未知の受容体が発現している可能性も示唆されており¹⁵⁾、マウスではその受容体が発現していないことが考えられる。そこで筆者らは、現在ヒトと同様にCD46をほぼすべての細胞で発現している霊長類を用いて35型Adベクターの遺伝子導入特性について検討している。霊長類を用いた研究により得られる結果は35型Adベクターの臨床応用に向けて極めて重要であるとともに、本研究を通してCD46TGマウスの35型Adベクターの特性を評価するための小動物モデルとしての妥当性も明らかになるであろう。

5. Subgroup B Adベクターの抱える問題点 —臨床応用に向けて—

Subgroup B Adベクターはこれまで紹介したように多くの長所を有している一方、臨床応用に向けて解明・改良していかなければならない点も残されている。1つは高タイトターのベクターが回収可能なパッケージング細胞の開発である。現在Subgroup B Adベクターの作製に用いられているSubgroup B AdのE1B55k発現293細胞、もしくは5型AdのE4タンパク発現293細胞で回収可能なベクター量は、5型Adベクター・293細胞の組合せと比較すると、若干低い。今後臨床応用に向けて高タイトターのベクターが必要になることを考慮すると、高収量が期待できるパッケージング細胞の開発は最重要課題である。さらにSubgroup B Adは他のSubgroupに属するAdと比較し、総じてPFU(Plaque Forming Unit)対Particleの比率が低い(つまり、感染力を持たないウイルス粒子の割合が高い)。この原因は不明であるが、ウイルス粒子に対する免疫応答(自然免疫および獲得免疫)は感染力を持たないウイルス粒子に対しても起こることを考慮すると、できる限り感染力を有したウイルス粒子の割合が高いベクターを調製することが副作用を抑えるためにも重要と思われる。

抗Ad中和抗体が多くはヘキソン領域を認識するため、ファイバー置換型5型Adベクターでは抗5型Ad抗体による問題を回避することができない。

3. Subgroup B Ad ベクターの作製

Subgroup B Adを自己複製能を欠失させた組換えAdベクターとするためには、5型Adベクターと同様に自己複製に必須の領域であるE1A領域(もしくはE1Bも含めたE1領域)を取り除くとともに、外来遺伝子発現カセットに置き換える必要がある。多くのグループは5型Adベクター同様、パッケージング細胞内での相同組換えを利用してE1領域を外来遺伝子に置き換えているが、この方法は煩雑である上に非効率的である。そこで筆者らは最も簡便な5型Adベクター作製法として用いられているプラスミド構築を利用した*in vitro* ligation法¹⁰⁾を35型Adベクターの作製にも適用することで、35型Adベクターを簡便に効率良く作製する方法の開発に成功した(図2)¹¹⁾。Subgroup B Adベクターの作製が5型Adベクターと大きく異なる点は、パッケージング細胞である。5型Adベクターを作製する場合には、通常パッケージング細胞として293細胞(5型AdのE1タンパク質を恒常的に発現している)が用いられているが、従来の293細胞では

E1欠損Subgroup B Adベクターを増幅させることはできず、5型AdのE4タンパク質、もしくはSubgroup B AdのE1B55kタンパク質発現293細胞を必要とする¹²⁾。なぜこれらの細胞ではSubgroup B Adベクターが増幅可能であるか? について詳細は不明であるが、E4タンパク質はE1B55kタンパク質と複合体を形成しウイルスRNAの細胞質輸送に関与することが報告されている。おそらくAdベクターが増幅するためにはE4タンパク質とE1B55kタンパク質が複合体を形成する必要があり、そのためにはE1B55kタンパク質とE4タンパク質が同じ血清型由来でなければならないのであろう。またこれらのパッケージング細胞では、Subgroup B Adベクターゲノムとパッケージング細胞に組み込まれたウイルス由来の遺伝子配列との間に相同な遺伝子配列が存在しない。そのため、293細胞を用いた5型Adベクター増幅では問題となる相同組換えによる野生型ウイルスの出現がSubgroup B Adベクター作製では理論上起こらず、安全性が高い。このことも本ベクター系の大きな特徴の一つである。

4. Subgroup B Ad ベクターの遺伝子導入特性

前述したように、11、35型Adをはじめとする多くのSubgroup B AdはCD46を受容体として認識する

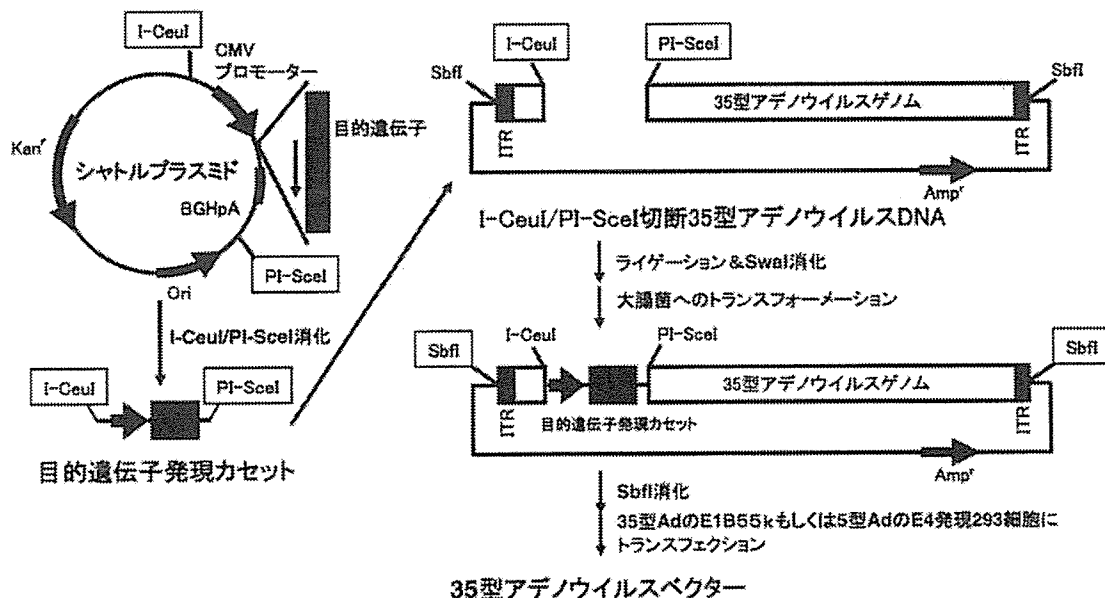


図2 *In vitro* ligationに基づいた簡便な35型アデノウイルスベクター作製方法

簡便な5型Adベクター作製方法として用いられている*in vitro* ligation法を35型Adベクター作製にも適用した。目的遺伝子を搭載したシヤトルプラスミドをI-CeuI/PI-SceIで切断する。これをI-CeuI/PI-SceIで切断した35型Adのベクタープラスミドとライゲーションする。作製したプラスミドをAdゲノム両端に存在する制限酵素部位SbfIで切断し、35型AdのE1B55k発現293細胞、もしくは5型AdのE4タンパク質発現293細胞にトランスフェクションすることで35型Adベクターができる。

(3型 Ad が CD46 を認識するかどうかについては意見が分かっている)。CD46 は 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、Neisseria などの感染受容体としても知られている。CD46 は分子量約 55 ~ 65kDa 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。このうち先端領域に位置する SCR1 および 2 が Subgroup B Ad 感染に関与していることが明らかとなっている。本来、補体制御因子である CD46 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。さらに CAR とは異なり、CD46 はヒトでは赤血球を除くほぼすべての細胞において発現している。そのため Subgroup B Ad ベクターは 5 型 Ad ベクターと比較して広い感染域を示し、CAR 陰性細胞を含む多くの細胞に対し高効率な遺伝子導入が可能である。これまで 5 型 Ad ベクターと比較し Subgroup B Ad ベクターによって遺伝子導入効率の改善が認められた細胞としては、樹状細胞、血管平滑筋細胞、滑膜細胞などが報告されている。加えて筆者らは、造血幹細胞を含む画分であるヒト骨髄由来 CD34 陽性細胞、さらにより未分化な画分である CD34 陽性 CD38 陰性細胞や CD34 陽性 AC133 陽性細胞に対しても 35 型 Ad ベクターが優れた遺伝子導入効率を示すことを見いだしている^{4,11)}。CD34 陽性細胞は遺伝子治療の重要な標的細胞であるが、CAR の発現が極めて低いため 5 型 Ad ベクターではほとんど遺伝子発現しない。しかし、35 型 Ad ベクターでは 50% 以上の細胞

が遺伝子発現を示した(図 3)。さらに筆者らは、35 型 Ad ベクターにより遺伝子発現を示した細胞が分化能ならびに増殖能を有していることを確認している。よって 35 型 Ad ベクターは自己増殖関連遺伝子導入による造血幹細胞増幅など、一過性の遺伝子発現が望ましい場合においては造血幹細胞への極めて有用な遺伝子導入用ベクターになるものと期待される。また CD46 は正常細胞よりもがん細胞において高発現していることが報告されており、この CD46 発現量の違いを利用して麻疹ウイルスを腫瘍溶解性ウイルスとして用いる試みが行われている。したがって、Subgroup B Ad ベクターもがんに対する優れた Targeting ベクターになり得るかもしれない。

一方で、Subgroup B Ad ベクターはげっ歯類由来の細胞に対してはほとんど遺伝子発現を示さない。これはげっ歯類では CD46 が精巣でしか発現していないこと、ヒトとげっ歯類では CD46 の相同性が低いことが要因と考えられる。そのため、5 型 Ad ベクターの場合にはマウスに尾静脈より全身投与すると全臓器、とくに肝臓において高い遺伝子発現量を示すが、Subgroup B Ad ベクターによる遺伝子発現量は 5 型 Ad ベクターと比較し 1~4 オーダー低い(臓器により異なる)¹²⁾。

そこで筆者らはヒトと同様にヒト 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効率を検討した。35 型 Ad ベクターを野生型および CD46TG マウスに静脈内および腹腔内投与したところ、両投与経路ともに CD46TG マウスの方が野生型マウスよりも有意に高い遺伝子発現効率を示した(図 4)¹³⁾。両方の相同染色体に CD46 遺伝子を有したホモ CD46TG マウスに 35 型 Ad ベクターを静脈内投与した場合の肝臓での遺伝子発現効率は、野生型マウスの約 10 倍、腹腔内投与した場合には約 500 倍高い値を示した。しかしながら CD46TG マウスでの 35 型 Ad ベクターの遺伝子発現効率は 5 型 Ad ベクターのものと比較すると依然低く、筆者らが期待するような劇的な遺伝子発現効率の改善は見られなかった。例えば 35

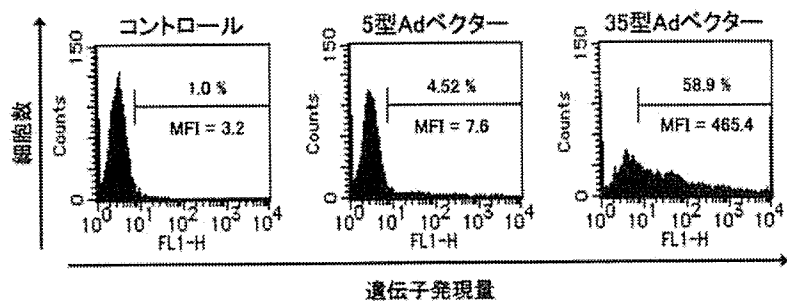


図3 Green fluorescence protein 発現 5 型ならびに 35 型アデノウイルスベクターによるヒト骨髄由来 CD34 陽性細胞への遺伝子導入効率
ヒト骨髄由来 CD34 陽性細胞に対し、Green fluorescence protein(GFP)発現 5 型ならびに 35 型 Ad ベクターを MOI(multiplicity of infection)300 で作用させ、48 時間後の遺伝子発現効率を測定した。グラフ内の数字は GFP 陽性細胞の割合(%), および平均蛍光強度(mean fluorescence protein : MFI)を示す。

また Subgroup B Ad は他の Ad とは受容体が異なるため、体内動態、細胞内動態、免疫応答などが他の Ad とは大きく異なることが予想される。とくに免疫応答に関しては、麻疹ウイルスやヒトヘルペスウイルス type6 など CD46 を受容体とする病原体では感染により CD46 の発現低下や免疫抑制など、特異的な反応を示すことが知られていることから、subgroup B Ad ベクターでも同様の反応を起こす可能性がある。これらの諸問題に対する Subgroup B Ad の基本特性はほとんど明らかになっておらず、これらを明らかにしていくことは今後の課題であろう。

おわりに

以上、本稿では筆者らが開発した 35 型 Ad ベクターを中心に、Subgroup B に属する Ad を基盤とした新規遺伝子導入用ベクターについて紹介した。遺伝子治療は初めての臨床研究が開始されてから 15 年以上が経過したが、明らかな成功例は数えるほどしかない。遺伝子治療の成功の鍵は高性能なベクター開発にあることを考慮すると、遺伝子導入用ベクターの開発・改良は今後の遺伝子治療の発展に向けて極めて重要である。しかしながら、我が国におけるベクター開発は欧米に比べると遅れをとっているのが現状である。今後、我が国独自のベクターが開発され、遺伝子治療の発展に大きく寄与することを期待したい。

謝辞

本稿で紹介した筆者らの研究は、(独)医薬基盤研究所遺伝子導入制御プロジェクト、国立医薬品食品衛生研究所遺伝子細胞医薬部および生物薬品部において行われたものであり、実験に協力していただいた関係者の皆様に深く感謝いたします。

参考文献

- 1) Havenga, M. J. *et al.* : Exploiting the natural diversity in adenovirus tropism for therapy and prevention of disease, *J. Virol.*, 76, 4612 ~ 4620 (2002)
- 2) Seshidhar Reddy, P. *et al.* : Development of adenovirus serotype 35 as a gene transfer vector, *Virology*, 311, 384 ~ 393 (2003)
- 3) Vlachaki, M. T. *et al.* : Impact of preimmunization on adenoviral vector expression and toxicity in a subcutaneous mouse cancer model, *Mol. Ther.*, 6, 342 ~ 348 (2002)
- 4) Sakurai, F. *et al.* : Efficient gene transfer into human CD34+ cells by an adenovirus type 35 vector, *Gene Ther.*, 10, 1041 ~ 1048 (2003)
- 5) Holterman, L. *et al.* : Novel replication-incompetent vector derived from adenovirus type 11 (Ad11) for vaccination and gene therapy : low seroprevalence and non-cross-reactivity with Ad5, *J. Virol.*, 78, 13207 ~ 13215 (2004)
- 6) Abrahamsen, K. *et al.* : Construction of an adenovirus type 7a E1A-vector, *ibid.*, 71, 8946 ~ 8951 (1997)
- 7) Sirena, D. *et al.* : The nucleotide sequence and a first generation gene transfer vector of species B human adenovirus serotype 3, *Virology*, 343, 283 ~ 298 (2005)
- 8) Gaggari, A. *et al.* : CD46 is a cellular receptor for group B adenoviruses, *Nat. Med.*, 9, 1408 ~ 1412 (2003)
- 9) Vogels, R. *et al.* : 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, 8263 ~ 8271 (2003)
- 10) Mizuguchi, H. *et al.* : Efficient construction of a recombinant adenovirus vector by an improved *in vitro* ligation method, *Hum. Gene Ther.*, 9, 2577 ~ 2583 (1998)
- 11) Sakurai, F. *et al.* : Optimization of adenovirus serotype 35 vectors for efficient transduction in human hematopoietic progenitors : comparison of promoter activities, *Gene Ther.*, 12, 1424 ~ 1433 (2005)
- 12) Sakurai, F. *et al.* : Characterization of *in vitro* and *in vivo* gene transfer properties of adenovirus serotype 35 vector, *Mol. Ther.*, 8, 813 ~ 821 (2003)
- 13) Sakurai, F. *et al.* : Adenovirus serotype 35 vector-mediated transduction into human CD46-transgenic mice, *Gene Ther.*, in press (2006)
- 14) Maisner, A. *et al.* : Membrane cofactor protein (CD46) is a basolateral protein that is not endocytosed, Importance of the tetrapeptide FTSL at the carboxyl terminus, *J. Biol. Chem.*, 272, 20793 ~ 20799 (1997)
- 15) Segerman, A. *et al.* : There are two different species B adenovirus receptors : sBAR, common to species B1 and B2 adenoviruses, and sB2AR, exclusively used by species B2 adenoviruses, *J. Virol.*, 77, 1157 ~ 1162 (2003)

13. 人工改変型ウイルスベクターの現状と今後の展開

倉知慎之輔・中川晋作

ウイルスベクターを用いた遺伝子導入法はウイルスの生活環を利用したものであるため、非ウイルスベクターと比較して極めて高い遺伝子導入・発現効率を有する一方で、治療を目的に生体へ適応した場合、ウイルスが本来もつ指向性により標的とする組織以外への移行ならびに遺伝子導入による副作用発現が問題となる。本稿では、アデノウイルスベクター (Adv) の外殻タンパク質を水溶性高分子で化学修飾することで、優れた遺伝子導入効率を保持したまま標的組織指向性をはじめとする drug delivery system (DDS) 機能を付与し、安全性に優れた次世代型ベクターを創製しようとするわれわれの試みを中心に概説する。

はじめに

遺伝子治療に代表される遺伝子関連研究の進展に向けての最大の鍵は、安全に効率よく目的とする細胞に治療用遺伝子を導入し、安定して発現させる遺伝子導入ベクターの開発にかかっている。現存するウイルスベクターには、アデノウイルスベクター (Adv) やレトロウイルスベクター、レンチウイルスベクター、アデノ随伴ウイルスベクターなどがある(表1)。それらウイルスベクターは、ウイルス特有の性質を有しているため、遺伝子治療に適用するにあたっては一長一短がある。一般的にウイルスベクターは、ウイルスの感染能力を利用するため、非ウイルスベクターと比較して圧倒的に優れた遺伝子導入・発現効率を有している。しかしながら、その反面、増殖性ウイルスの出現や免疫原性、細胞毒性、発癌性などに関する懸念がぬぐいきれないことや、標的組織や細胞に遺伝子導入するにあたっては、ウイルスが有する組織あるいは細胞特異性に左右されること、またウイ

ルスに対する抗体産生や、中和抗体存在下では遺伝子導入効率が低下するなどの問題点を有している。近年、遺伝子工学技術を駆使して、これら種々の問題点の克服を目指した人工改変型ウイルスベクターの開発が精力的に行われている。しかしながら、遺伝子工学的手法だけによる改良には限界があり、新たに別な観点からのアプローチが緊急課題となっている。

われわれは、Advを水溶性高分子で化学修飾することでAdvの問題点を克服し、さらにターゲティング能を兼ね備えた次世代型ベクターの開発を行っており、この点について概説する。

I. Advの特徴とその現状

2005年現在、遺伝子治療の臨床研究プロトコルは約600にも達し、その中でAdvは全体の約26%を占めており、最も古くより開発・研究が進んでいるレトロウイルスベクターについて2番目に多い。ベクターとして用いられるアデノウイルス (Ad) は主に、ヒトアデノウイルス2型あるいは5

key words

アデノウイルスベクター (Adv), polyethylene glycol (PEG), ターゲティング, 遺伝子治療, DDS (drug delivery system), 抗体回避能, 血中滞留性