

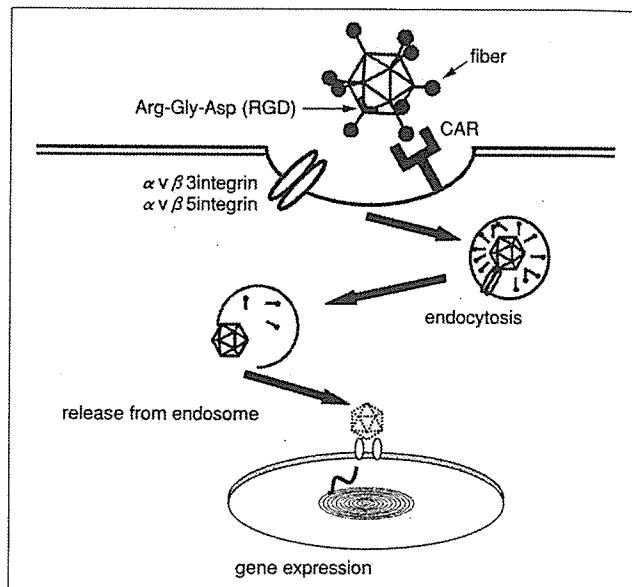
表① 各ウイルスベクターの特徴

ベクター名	特徴
アデノウイルスベクター	高い遺伝子導入・発現効率 分裂細胞・非分裂細胞を問わず広い細胞種に導入可能 高タイトーのベクター調製が容易 免疫原性が高い
レトロウイルスベクター	長期的な遺伝子発現 ランダムな遺伝子のインテグレーションによる細胞の癌化の可能性 非分裂細胞への遺伝子導入が困難
レンチウイルスベクター	長期的な遺伝子発現 分裂細胞・非分裂細胞を問わず広い細胞種に導入可能 ランダムな遺伝子のインテグレーションによる細胞の癌化の可能性
アデノ随伴ウイルスベクター	長期的な遺伝子発現 免疫原性が低い 搭載可能な遺伝子サイズが小さい 遺伝子導入・発現効率が乏しい ベクターの大量調製が困難

型であり、臨床的には小児の急性気道炎、角結膜炎、膀胱炎などを引き起こすウイルスとして知られている。Adは二本鎖DNAをもち、252個のカプソメアから構成され、正20面体構造をしている。各頂点の突起構造はペントン（ペントンベースとファイバー¹⁾からなる）と呼ばれ、残りの240個はヘキソンという。Advの細胞内への侵入は2段階にわたる細胞表面上のレセプターとの相互作用によって成立する（図①）。すなわち、ファイバー部分がcoxsackie and adenovirus receptor (CAR)と結合し（第一段階）、続いて細胞の接着分子であるインテグリンとペントンベースに存在するArg-Gly-Asp (RGD)モチーフとの相互作用により細胞内への取り込みが起こる（第二段階）。その後、エンドソーム内から細胞質内へ遊離し、最終的に核へ移行して遺伝子発現に至る。

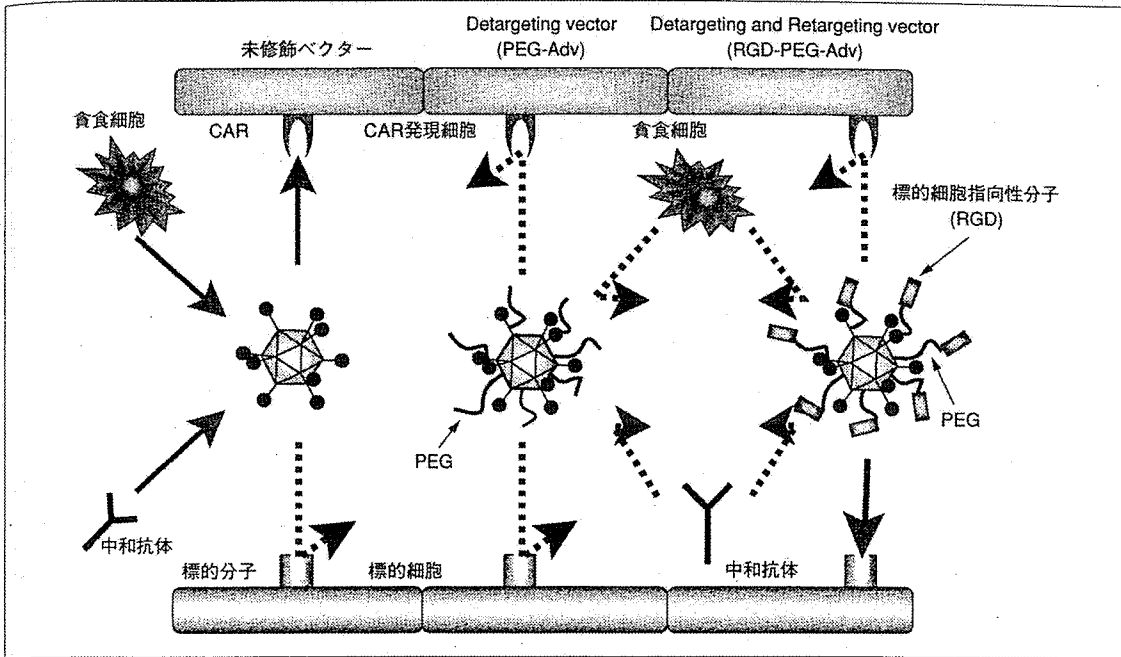
Advは、他のベクターと比較して遺伝子導入効率・発現効率が極めて高いという利点を有する一方で、組織特異性に乏しい、免疫原性が高いなどの問題点を有している。組織特異性の制御にあたっては、これまでにウイルスファイバー部分に遺伝子工学的手法を用いてRGDペプチドやポリリジン配列を挿入することで、インテグリンあるいは

図① アデノウイルスの感染メカニズム



ヘパラン硫酸を介して遺伝子導入されるベクターが開発されている²⁾。また、Advのファイバー部分をCAR以外のレセプター（多くの細胞種に発現しているCD46など）を認識して感染する35型Adのファイバーに置換したベクター²⁾も開発されている。これらのベクターを用いることで、従来のAdvでは遺伝子導入が困難であったCAR欠損あるいは低発現の癌細胞や血球系細胞などに対しても高い遺伝子発現が可能となった。特にRGD配列を

図② 標的細胞指向性ベクターを開発するためのストラテジー



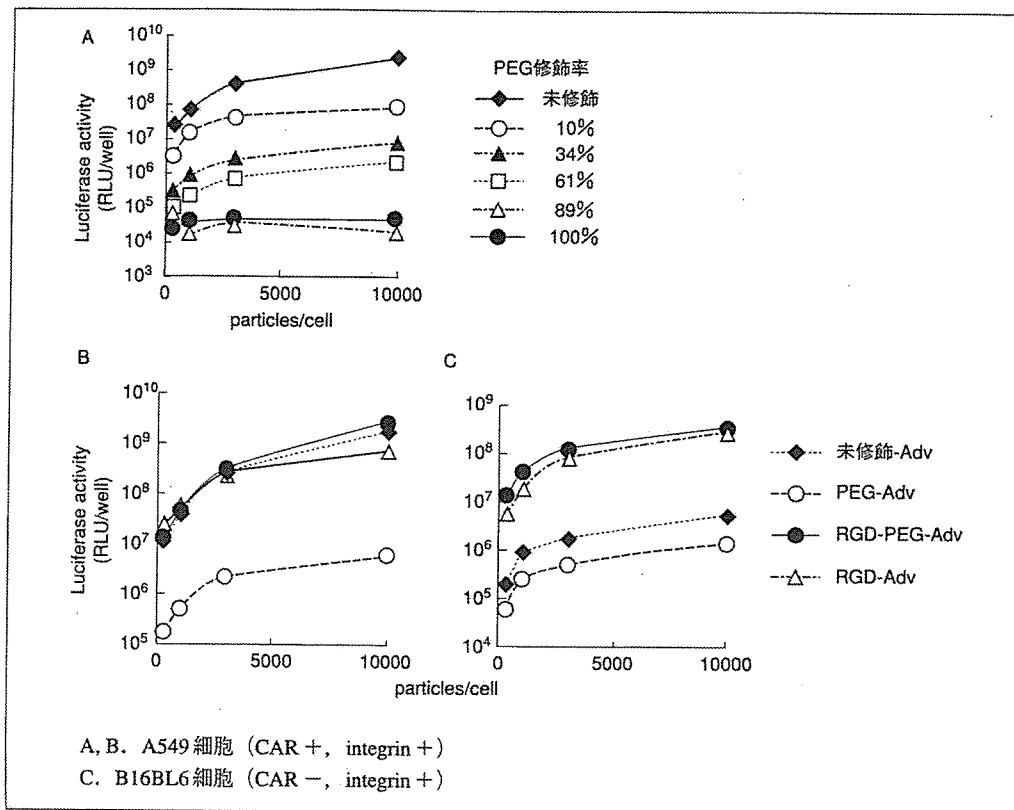
挿入した Adv (RGD-Adv) は、多くの細胞に対して CAR 発現の有無にかかわらず、従来型の Adv と比較して同等あるいはそれをはるかに超える高い遺伝子発現を達成できる優れたベクターである³⁾。これまでに本ベクターを用いることで、サイトカインやケモカイン遺伝子による癌免疫療法ならびに樹状細胞ワクチン療法において優れた成果を得ている⁴⁾。

しかし一方で、血液を介してのターゲティングを想定した場合、標的組織に効率よく移行させるためには克服すべき別の問題が存在する。例えば、Adv は静脈内投与後速やかに血液中から消失してしまうため（マウスの場合 90% 以上は肝臓に集積する）、ベクターと標的組織との接触頻度が少なく、標的組織へのターゲティングは困難である。また臨床においては、多くのヒトが Ad に対する抗体を保有しており、中和抗体による遺伝子導入効率の低下やアナフィラキシーショックなどの危険性があり、中和抗体存在下においても治療可能なベクターの開発も望まれている。これらの問題点については、遺伝子工学的的手法だけでは解決することが困難である。

II. 表面修飾型 Adv の開発

われわれは生体適応性に優れた非電荷水溶性高分子 polyethylene glycol (PEG) を用いて Adv の外殻タンパク質を化学修飾することで、Adv のもつ欠点を克服した次世代型 Adv の開発を目指している。PEG をはじめとする水溶性高分子は、これまでにタンパク質やリポソームの分野で広く用いられており、それらの免疫原性の低下や血中滞留性の上昇という医薬品としての価値が付加できることが報告されている。われわれは既に TNF α などのサイトカインを PEG で化学修飾することで分子表面に水和層が形成され、その立体的な障害によりレセプターへの結合が阻害され比活性の著しい低下を招くものの、プロテアーゼや中和抗体からの回避能を獲得し、その結果、血中半減期が上昇するということを見出している⁶⁾。また、抗原提示細胞への取り込みも低下するため免疫原性の低下も報告されている。このようなタンパク質のバイオコンジュゲート化により得られる特性は、Adv を水溶性高分子でバイオコンジュゲーションした場合にも同様に得られると考えられる (図②)。

図3 遺伝子発現効率の検討



そこで、まず分子量5000のPEGを用いて様々な修飾率のAdvを作製し、その特性を評価した。PEG修飾Adv (PEG-Adv)は、Adv表面のリジン残基を標的に活性化PEGを混和することで作製した。まず、このPEG-Advの血中滞留性を評価したところ、PEG修飾率の増大に伴い血中半減期が飛躍的に上昇した。この結果は、PEG鎖の立体障害により肝臓などに存在する食系細胞への取り込みが阻害されるとともにCARを介した組織への移行が制限されたことによると考えられる。また、PEG-Advの*in vitro*での遺伝子発現を評価したところ、未修飾Advでは高い遺伝子発現が得られるのに対して、PEG-Advは修飾率の増大に伴い顕著に遺伝子発現が低下した(図3A)。特に修飾率60%以上のものに関して、その遺伝子発現は未修飾体の約1/100以下と低いものであった。この結果は、AdvをPEG修飾することでPEG鎖の立体障害によりCARとの結合が阻害され、Advが細胞内に導入で

きなかったためであると考えられる。事実、PEG-Advをリポフェクション法により細胞内に強制的に導入したところ、高い遺伝子発現が得られており、またこの事実はAdvに対するPEGylationが遺伝子発現活性を保持した状態で修飾できていることを示すものである。

以上、Advの外殻タンパク質をPEG修飾することで、血中滞留性が向上し、さらにはCARを介した目的としない細胞への遺伝子導入を阻害することができることが明らかとなった。今後は遺伝子工学的な手法との融合により、さらに有用なベクター開発が可能となるであろう。

III. 標的指向性を付与したハイブリッドAdvの開発

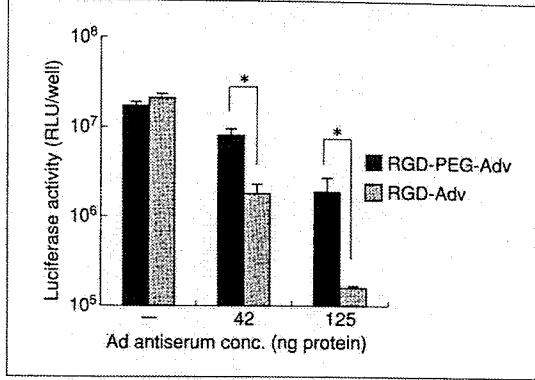
遺伝子を薬物とみなす遺伝子治療においても、これまでの低分子有機化合物を中心とした薬物治療と同様に、標的組織へのみ遺伝子を送達させる、

あるいは標的組織でのみ遺伝子を発現させるのが理想である。この標的組織へのターゲティングを行うにあたっては、標的組織以外への移行性、すなわち非特異的なデリバリーを抑制 (detargeting) すると同時に、積極的に標的部位へデリバリー (retargeting) させることが必要である。これまでの検討で、AdvをPEG修飾することで、①PEG-Advが血中滞留性に優れていること、②CARを介した非特異的な遺伝子導入を抑えることができること (図②)、③そのPEG-Advを細胞内に導入すれば高い遺伝子発現が得られることなどを明らかにした。そこで次の段階として、PEG鎖先端に標的指向性分子を付与することができれば、先に示したPEG-Advの特性を保持した状態で、その標的指向性分子の作用により、積極的に標的細胞にのみ遺伝子導入が可能でベクターが創製できると考えられる (図②)。

われわれは、標的指向性分子のモデルとしてインテグリンと親和性をもつRGDモチーフを選択し、RGDをPEG鎖の先端に付与したRGD-PEG修飾Adv (RGD-PEG-Adv) を作製した⁹⁾。このRGD-PEG-Advの遺伝子発現特性を *in vitro* にて評価した結果、これまでのPEG-Advでは、先に示したとおりCAR発現細胞であるにもかかわらず十分な遺伝子発現が得られないのに対して、RGD-PEG-Advは未修飾のAdvと同等の高い遺伝子発現を示した (図③B)。また、CAR低発現細胞に対しては、未修飾のAdvでも十分な遺伝子発現が得られないのに対して、RGD-PEG-AdvではCAR低発現細胞に対しても高い遺伝子発現活性を有するRGD-Advと同等の遺伝子発現が得られている (図③C)。これらの現象は、RGDペプチドを用いた競合阻害実験からPEG末端のRGDモチーフを介して細胞内へ遺伝子がデリバリーされていることを確認している。

また、RGD-PEG-Advの抗体回避能について検討したところ、RGD-Advは抗血清濃度の上昇に伴い遺伝子発現は急激に低下したのに対して、RGD-PEG-Advは高い遺伝子発現を保持し、その抗体回避能はRGD-Advの15倍であった (図④)。本結果は、RGD-PEGの修飾率が35.6%のRGD-PEG-Adv

図④ RGD-PEG-Advの抗体回避能



を用いているが、この修飾率を高めればウイルスあたりのRGD分子も多く提示されることになり、結果的にインテグリンを介した遺伝子導入効率が上昇する可能性がある。すなわち、標的指向性分子を付与した水溶性高分子を用いたAdvのハイブリッド化の場合には、修飾率の増大に伴い、標的指向性分子の作用が強くなるだけでなく、Advに対する中和抗体からの回避能も増大すると考えられることから、本方法は理想的な遺伝子治療用ベクターとして創製できる可能性を示している。

IV. 今後の展望

今回は、モデル標的指向性分子としてRGDを選択し、RGD-PEG-Advの有用性を示したが、われわれの報告以外には、甲状腺髄様癌細胞 (medullary thyroid carcinoma) に親和性を有するペプチドをPEGの先端に提示させたものや¹⁰⁾、FGF2 (fibroblast growth factor) を結合させ、FGFレセプターを介して遺伝子発現を達成しようとする試みがある¹¹⁾。しかしながら、これらの報告では、ハイブリッド化Advが目的とする標的細胞に遺伝子導入できたとしても、その発現レベルはあまりにも低いため現状では実用化できる状況ではない。今後、実用化レベルで標的組織指向性を有するハイブリッド化Advを開発していくためには、標的組織特異性ならびに親和性に優れた分子を検索し、それをPEGの先端に提示させなければならない。標的組織指向性分子については抗体やペプチドが候補として考えられるが、目的に応じた特異性や結合

力を有する抗体やペプチドを迅速かつ簡便に単離・同定できる技術としてファージ表面提示法が注目を浴びている。われわれは、既にファージ表面提示法を駆使して一本鎖ナノ抗体ライブラリーやペプチドライブラリーを構築し、特異性や結合力に優れた一本鎖抗体やペプチドを探索できるシステムを確立している¹³⁾。今後このシステムを活用することで、特異性ならびに親和性に優れた標的指向性分子を見出せるものと考えている。

また、より効果的なハイブリッド化Advを創製する場合には、修飾高分子による修飾率ならびに修飾部位の厳密な制御が求められる。Advに対するPEGylationはウイルス表面のリジン残基に対してランダムに行われており、現在の技術では修飾部位を制御することはできない。われわれはPEGとAdvの反応比を変えることで、様々な修飾率のPEG-Advを作製することに成功しており¹⁴⁾、また修飾部位の制御についても確立しなければならない重要課題として現在取り組んでいる。さらにハイブリッド化Advの場合、用いる修飾高分子の種類や分子量・形状などによっても、その体内動態や遺伝子発現特性などが大きく変化すると予想される。これまでにわれわれは、ポリビニルピロリドン (PVP) がPEGよりも血中滞留性に優れていること¹⁵⁾、さらにはPVPにジメチル無水マレイン酸を導入することで極めて高い腎集積性を有することなどを明らかにしている¹⁶⁾。従って、このようなある特定の組織に指向性を有する高分子を用いてAdvをハイブリッド化すれば、その高分子の体内動態特性に応じた遺伝子発現が得られる可能性がある。このようにAdvの高分子ハイブリッド化

は、遺伝子工学的手法により最大限に改良されたAdvに対して、さらに有効性と安全性を高めることができる有用な方法であり、遺伝子治療分野において無限の可能性を提供できる技術であると考えている。

おわりに

今後、ポストゲノム研究はますます進展し、多様化を増していくと考えられる。そのなかで遺伝子導入技術は、基礎から臨床にいたるあらゆる領域で必須の基盤技術である。従って、優れた遺伝子導入用ベクターを開発することは、ライフサイエンスの研究領域の進展に大きな影響を与えらるゝといっても過言ではない。ベクター開発を行うにあたっては、非ウイルスベクター、ウイルスベクターの枠にとらわれることなく、各ベクターの利点・欠点を十分に理解したうえで、遺伝子工学や高分子化学、ナノテクノロジーなどのありとあらゆる技術を駆使して、その利点を最大限に発揮させるとともに、欠点の完全克服を目指さなければならない。

本稿で概説してきたウイルスベクターの外殻タンパク質を水溶性高分子で修飾する試みは、Advのみにとどまらず、アデノ随伴ウイルスベクター、レンチウイルスベクターでも適応できる基本技術であり¹⁹⁾¹⁰⁾、今後のライフサイエンス研究に大きく貢献できることを願ってやまない。

本研究は、医薬基盤研究所遺伝子導入制御プロジェクト 水口裕之博士、神戸学院大学薬学研究科 川崎紘一博士をはじめとする先生方のご協力のもと行われたものであり、共同研究者に深謝致します。

用語解説

1. ファイバー：アデノウイルスの主要な外殻タンパク質の1つであり、正20面体の各頂点に存在しアデノウイルス1粒子につき12のファイバーがある。ファ

イバーはノブ、シャフト、テールと呼ばれる3つの部位から形成され、一番先端に位置するノブの部分がCARとの結合に関与している。

参考文献

- 1) Koizumi N, et al : J Gene Med 5, 267-276, 2003.
- 2) Mizuguchi H, et al : Gene 285, 69-77, 2002.
- 3) Gao JQ, et al : Pharmazie 59, 571-572, 2004.
- 4) Gao JQ, et al : Cancer Res 63, 4420-4425, 2003.
- 5) Okada N, et al : Cancer Res 61, 7913-7919, 2001.
- 6) Tsutsumi Y, et al : J Pharmacol Exp Ther 278, 1006-1011, 1996.
- 7) Eto Y, et al : Biol Pharm Bull 27, 936-938, 2004.
- 8) Eto Y, et al : J Gene Med 7, 604-612, 2005.
- 9) Maeda M, et al : Bioorg Med Chem Lett 15, 621-624,

2005.

- 10) Bockmann M, et al : J Gene Med 7, 179-188, 2005.
- 11) Lanciotti J, et al : Mol Ther 8, 99-107, 2003.
- 12) Okamoto T, et al : Biochem Biophys Res Commun 323, 583-591, 2004.

参考図書

* 遺伝子医薬品のDDS ファインケミカルシリーズ ドラッグデリバリーシステムの新展開-究極の薬物治療をめざして, 衛藤佑介, 真弓忠範, 中川晋作, 252-265, シーエムシー出版, 2004.

参考ホームページ

・ 大阪大学大学院薬学研究科薬剤学分野
<http://www.phs.osaka-u.ac.jp/homepage/b011/>

- 13) Kamada H, et al : Biochem Biophys Res Commun 257, 448-453, 1999.
- 14) Kamada H, et al : Nat Biotechnol 21, 399-404, 2003.
- 15) Lee GK, et al : Biotechnol Bioeng 92, 24-34, 2005.
- 16) Croyle MA, et al : J Virol 78, 912-921, 2004.

中川晋作

- 1984年 神戸学院大学大学院薬学研究科修士課程修了
参天製薬(株)中央研究所研究員
- 1988年 神戸学院大学薬学部助手
- 1993年 大阪大学薬学部助手
- 1994年 同講師
- 1997年 The Toront Hospital Research Institute 研究員
- 1999年 大阪大学大学院薬学研究科助教授
- 2005年 大阪大学大学院薬学研究科薬剤学分野教授

研究内容: 遺伝子やタンパク質, 細胞などを用いたDDS研究に従事し, 細胞の機能を利用した究極の薬物療法の開発を目指している。

第1章

遺伝子導入のための材料