

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^{4,9)}。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る、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

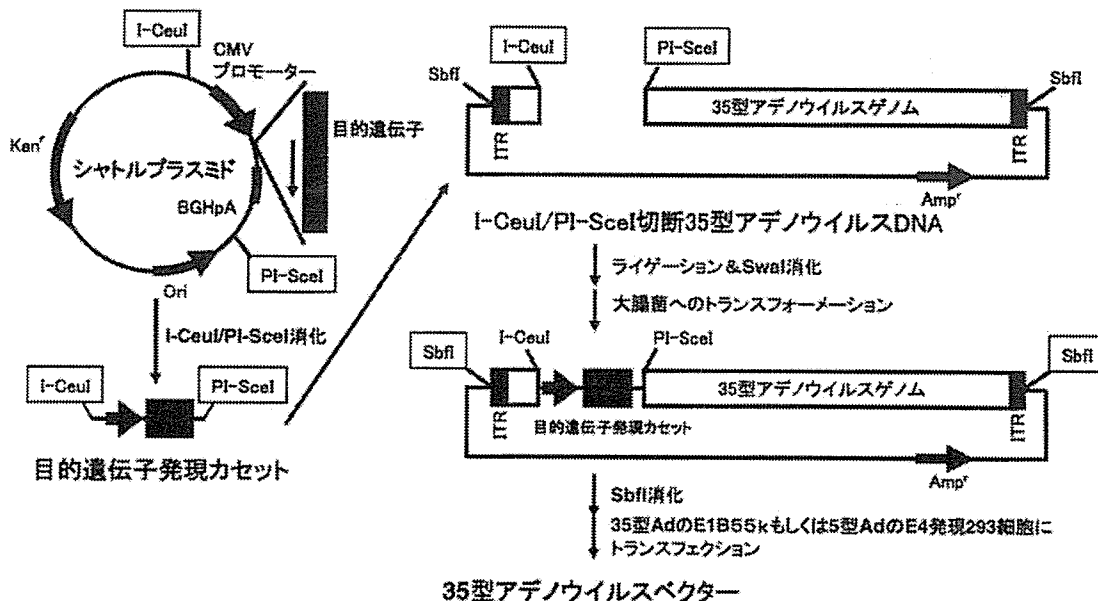


図2 *In vitro* ligationに基づいた簡便な35型アデノウイルスベクター作製方法

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ャトルプラスミドを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髓由来 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^{40,41)}。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

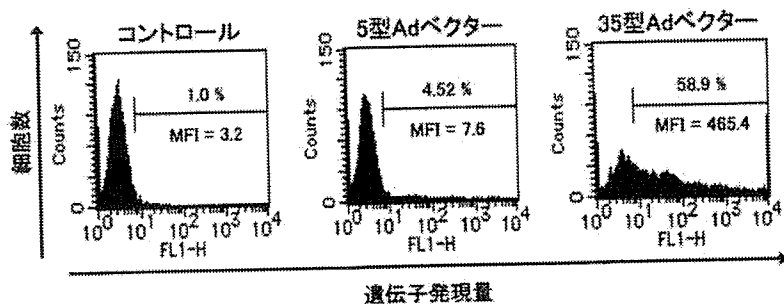


図3 Green fluorescence protein 発現 5 型ならびに 35 型アデノウイルスベクターによるヒト骨髓由来 CD34 陽性細胞への遺伝子導入効率
ヒト骨髓由来 CD34 陽性細胞に対し、Green fluorescence protein(GFP)発現 5 型ならびに 35 型 Ad ベクターを MOI(multiplicity of infection)300 で作用させ、48 時間後の遺伝子発現効率を測定した。グラフ内の数字は GFP 陽性細胞の割合(%), および平均蛍光強度(mean fluorescence protein : MFI)を示す。

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・研究の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

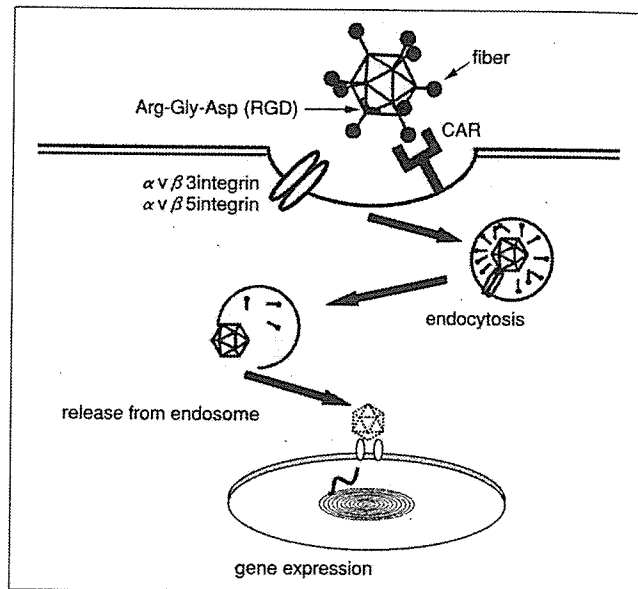
表① 各ウイルスベクターの特徴

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用脚りからなる）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。

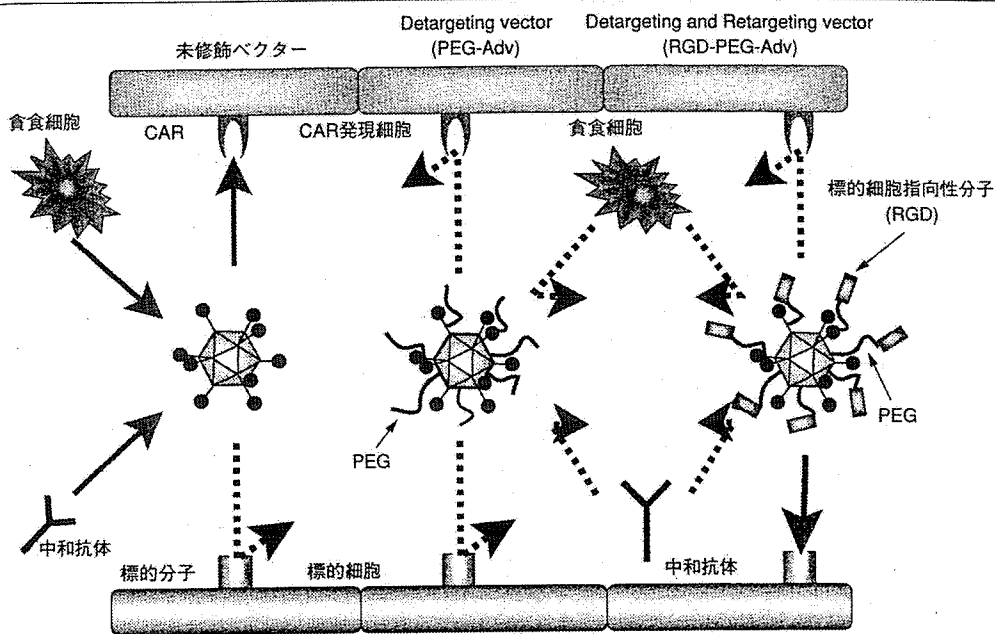
Advは、他のベクターと比較して遺伝子導入効率・発現効率が極めて高いという利点を有する一方で、組織特異性に乏しい、免疫原性が高いなどの問題点を有している。組織特異性の制御にあたっては、これまでにウイルスファイバー部分に遺伝子工学的手法を用いてRGDペプチドやポリリジン配列を挿入することで、インテグリンあるいは

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¹⁾。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

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



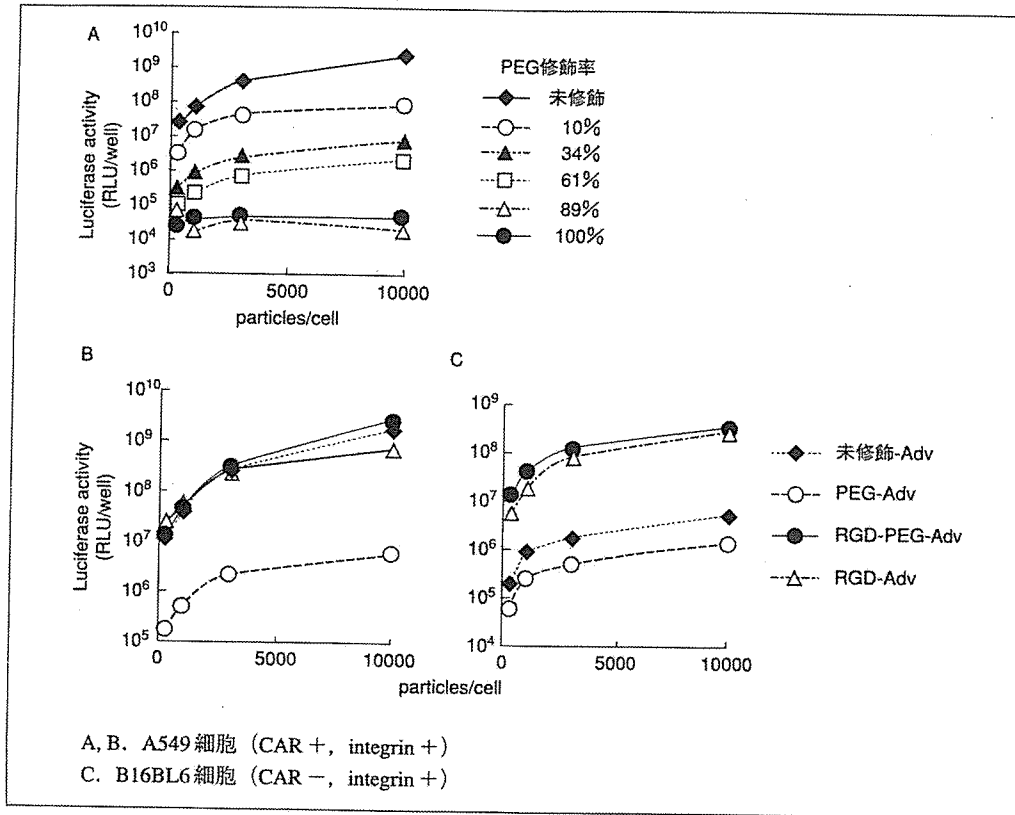
挿入した Adv (RGD-Adv) は、多くの細胞に対して CAR 発現の有無にかかわらず、従来型の Adv と比較して同等あるいはそれをはるかに超える高い遺伝子発現を達成できる優れたベクターである³⁾。これまでに本ベクターを用いることで、サイトカインやケモカイン遺伝子による癌免疫療法ならびに樹状細胞ワクチン療法において優れた成果を得ている⁴⁾⁵⁾。

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ボ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見出ししている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⁷⁾。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貪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

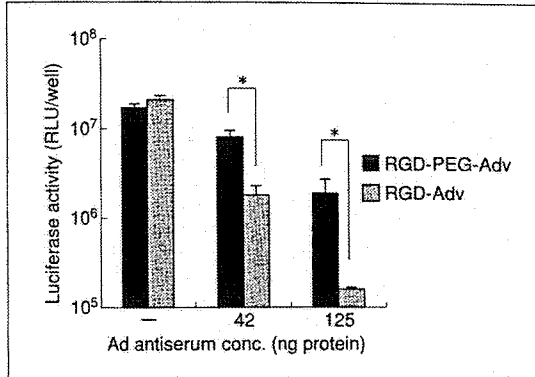
遺伝子を薬物とみなす遺伝子治療においても、これまでの低分子有機化合物を中心とした薬物治療と同様に、標的組織へのみ遺伝子を送達させる、

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な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現れるだけでなく、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イーブ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⁸⁾、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¹³⁾、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¹⁴⁾。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であろう。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¹⁵⁾¹⁶⁾、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所 川崎絃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.

- 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.

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/>

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

Mini Review

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

水口裕之¹⁾，川端健二¹⁾，櫻井文教¹⁾，早川堯夫²⁾

¹⁾独立行政法人医薬基盤研究所 遺伝子導入制御プロジェクト

²⁾独立行政法人医薬品医療機器総合機構

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

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

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

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

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

²⁾Pharmaceuticals and Medical Devices Agency

Key words

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

はじめに

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

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

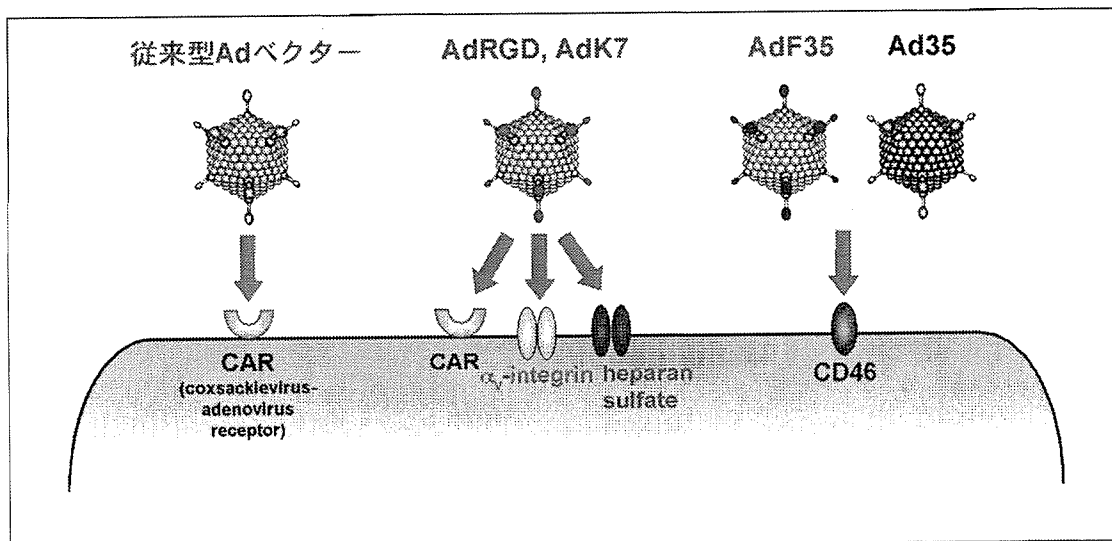


図1 改良型アデノウイルスベクターによる遺伝子導入

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

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

改良型アデノウイルスベクター

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

筆者らは、ファイバータンパク質の外来ペプチド挿入

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

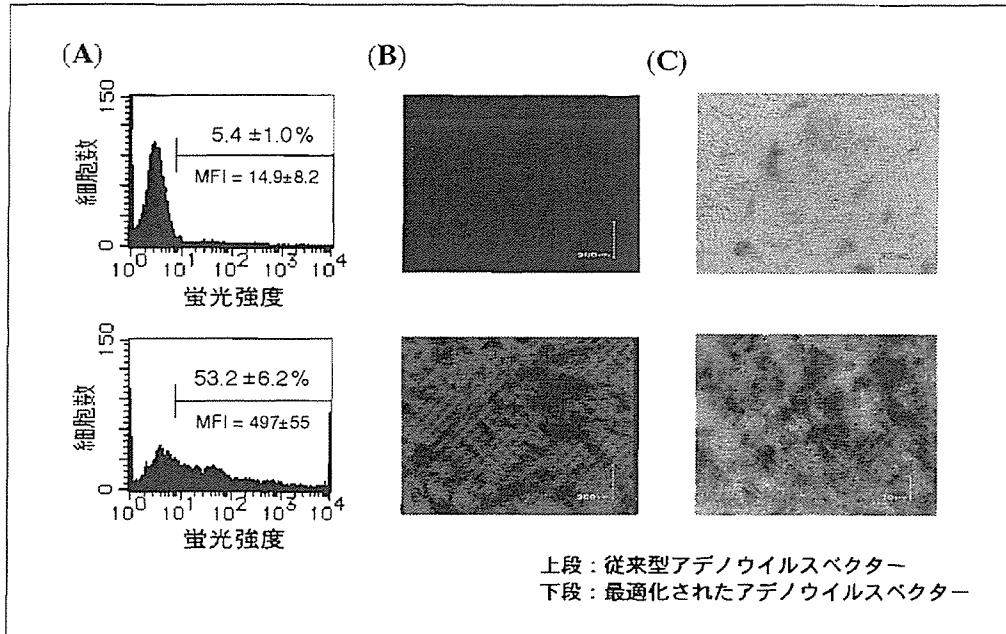


図2 改良型アデノウイルスベクターによる造血幹細胞(A)、間葉系幹細胞(B)、ES細胞(C)への高効率遺伝子導入

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

改良型アデノウイルスベクターによる高効率遺伝子導入

1)造血幹細胞への遺伝子導入

ヒト造血幹細胞を含む画分であるCD34陽性細胞(本総説ではヒト造血幹細胞を含む画分であるCD34陽性細胞をあえて造血幹細胞として記述させていただく)では、CAR陽性細胞は数%と少なく、5型アデノウイルスベクターによる遺伝子導入効率も4~5%と極めて低い⁶⁾。一方、ほぼ全てのCD34陽性細胞はCD46を発現しており、35型アデノウイルスベクターを用いると50%以上の細胞に目的遺伝子を発現させることができる⁷⁾(図2A)。理由は不明

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

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

2) 間葉系幹細胞への遺伝子導入

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

3) ES細胞への遺伝子導入

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

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

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

4) 幹細胞以外の細胞への遺伝子導入

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

また、従来の5型アデノウイルスベクターでは、遺伝子導入が困難であった様々な細胞株についても、多くの場合ファイバー改変ベクターを用いることで遺伝子導入効率の改善が期待できる。例えば脂肪細胞分化研究に汎用されているマウス3T3-L1細胞では、ポリリジンペプチドを付与したファイバー改変ベクターを用いれば、90%以上の細胞に遺伝子を導入、発現させることができる¹⁶⁾(従来型アデノウイルスベクターでは数%の遺伝子導入効率しか示さない)。

おわりに

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

文献

- 1) Mizuguchi H, Koizumi N, Hosono T, Utoguchi N, Watanabe Y, Kay MA, Hayakawa T: A simplified system for constructing recombinant adenoviral vectors containing heterologous peptides in the HI loop of their fiber knob. *Gene Ther*, 8: 730-735, 2001.
- 2) Koizumi N, Mizuguchi H, Utoguchi N, Watanabe Y, Hayakawa T: Generation of fiber-modified adenovirus vector containing heterologous peptides in both the HI loop and C terminus of the fiber knob. *J Gene Med*, 5: 267-276, 2003.
- 3) Mizuguchi H, Kay MA: Efficient construction of a recombinant adenovirus vector by an improved in vitro ligation method. *Hum Gene Ther*, 9: 2577-2583, 1998.
- 4) Mizuguchi H, Kay MA: A simple method for constructing E1 and E1/E4 deleted recombinant adenovirus vector. *Hum Gene Ther*, 10: 2013-2017, 1999.
- 5) Mizuguchi H, Hayakawa T: Adenovirus vectors containing chimeric type 5 and type 35 fiber proteins exhibit altered and expanded tropism and increase the size limit of foreign genes. *Gene*, 285: 69-77, 2002.
- 6) Sakurai F, Mizuguchi H, Hayakawa T: Efficient gene transfer into human CD 34⁺ cells by an adenovirus type 35 vector. *Gene Ther*, 10: 1041-1048, 2003.
- 7) Sakurai F, Mizuguchi H, Yamaguchi T, Hayakawa T: Characterization of in vitro and in vivo gene transfer properties of adenovirus serotype 35 vector. *Mol Ther*, 8: 813-821, 2003.
- 8) Sakurai F, Mizuguchi H, Kawabata K, Yamaguchi T, Hayakawa T: Optimization of adenovirus serotype 35 vectors for efficient transduction in human hematopoietic progenitors: comparison of promoter activities. *Gene Ther*, (in press), 2005.
- 9) Mizuguchi H, Kawabata K, Sakurai F, Sasaki T, Hayakawa T: Fiber-modified adenovirus vectors mediate efficient gene transfer into human mesenchymal stem cells and adipocytes. *Biochem Biophys Res Commun*, 332: 1101-1106, 2005.
- 10) Kawabata K, Mizuguchi H, Sakurai F, Yamaguchi T, Hayakawa T: Efficient gene transfer into mouse embryonic stem cells with adenovirus vectors. *Mol Ther*, 12: 547-554, 2005.
- 11) Niwa H, Burdon T, Chambers I, Smith A: Self-renewal of pluripotent embryonic stem cells is mediated via activation of STAT3. *Genes Dev*, 12: 2048-2060, 1998.
- 12) Mitsui K, Tokuzawa Y, Itoh H, Segawa K, Murakami M, Takahashi K, Maruyama M, Maeda M, Yamanaka S: The homeoprotein Nanog is required for maintenance of pluripotency in mouse epiblast and ES cells. *Cell*, 113: 631-642, 2003.
- 13) Chambers I, Colby D, Robertson M, Nichols J, Lee S, Tweedie S, Smith A: Functional expression cloning of Nanog, a pluripotency sustaining factor in embryonic stem cells. *Cell*, 113: 643-655, 2003.
- 14) Okada N, Tsukada Y, Nakagawa S, Mizuguchi H, Mori K, Saito T, Fujita T, Yamamoto A, Hayakawa T, Mayumi T: Efficient gene delivery into dendritic cells by fiber-mutant adenovirus vectors. *Biochem Biophys Res Commun*, 282: 173-179, 2001.
- 15) Okada N, Saito T, Masunaga Y, Tsukada Y, Nakagawa S, Mizuguchi H, Mori K, Okada Y, Fujita T, Hayakawa T, Mayumi T, Yamamoto A: Efficient antigen gene transduction using Arg-Gly-Asp fiber-mutant adenovirus vectors can potentiate anti-tumor vaccine efficacy and maturation of murine dendritic cells. *Cancer Res*, 61: 7913-7919, 2001.
- 16) Hosono T, Mizuguchi H, Katayama K, Koizumi N, Kawabata K, Yamaguchi T, Nakagawa S, Watanabe Y, Mayumi T, Hayakawa T: RNA interference of PPAR γ using fiber-modified adenovirus vector efficiently suppresses preadipocyte-to-adipocyte differentiation in 3T3-L1 cells. *Gene*, 348: 157-165, 2005.

Cell delivery system に基づく次世代がん免疫療法

特集 耐性克服と DDS

杉田敏樹・高 建青・中川晋作*

Development of cell delivery system for optimal cancer immunotherapy

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

がん免疫療法においては、がん細胞を直接傷害する免疫系細胞群やがん抗原の情報をこれら細胞群に提示し、活性化させる抗原提示細胞が生体内において実際の治療を担う“薬物”として作用する。したがって、drug delivery system(DDS)の観点からは、これら“生きた薬物”としての免疫系細胞群の体内動態を制御することが、がん免疫療法の最適化を達成するうえで重要である。本稿では、生きた細胞を薬物として捉えた cell delivery system とよぶべき新たな DDS の概念について、筆者らの研究成果を中心に報告する。

*Toshiki Sugita · Jian-Qing Gao · Shinsaku Nakagawa**

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

Cell delivery system に基づいたがん免疫療法

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

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

し自身の免疫機構を利用してがん細胞を排除しようとする治療法である。

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

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

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

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

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

ケモカインを介した細胞浸潤機構

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

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

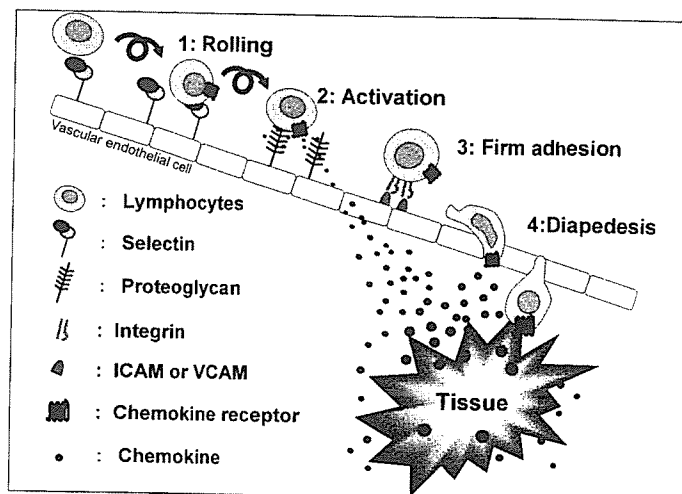


図1 Scheme of lymphocytes infiltration into tissue

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

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

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

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

筆者らは, このケモカインが有する細胞遊走活性

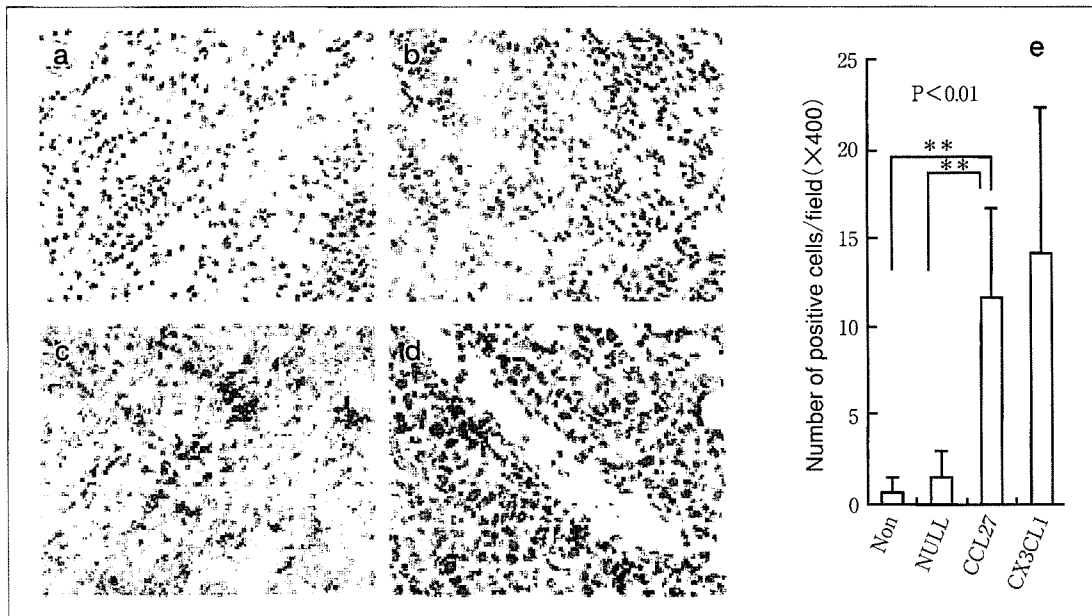


図 2

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

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

ケモカインによる腫瘍組織内への細胞浸潤と腫瘍増殖抑制効果

筆者らは、数あるケモカインのなかでも、がんのエフェクター細胞である T 細胞や NK 細胞、免疫細胞の司令塔である DC などを遊走させることが *in vitro* で示唆されているケモカイン (CCL19⁹, CCL20⁷, CCL22⁸, CCL27⁹, XCL1¹⁰, CX3CL1¹¹) を選択し、それらを腫瘍組織に発現させることによる腫瘍組織内への細胞浸潤と腫瘍増殖抑制について検討を行った¹²⁻¹⁵。腫瘍細胞にケモカインを発現させるにあたっては、ファイバー領域にインテグリン指向性の RGD 配列 (Arg-Gly-Asp) を挿入したファイバーミュータントアデノウイルスベクター (Ad-RGD) を用いた¹⁶。この Ad-RGD は従来型アデノウイルスベクターとくらべ、高い遺伝子導入効率・発現効率を有している。

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

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

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

し、この CD3 陽性 T 細胞の腫瘍内浸潤は、腫瘍増殖抑制が認められなかった CX3CL1 発現 OV-HM 細胞移植群でも認められた。

そこで、両者の違いを明らかにすべく、その浸潤像を詳細に観察した結果、CX3CL1 発現 OV-HM 細胞移植群では CD3 陽性 T 細胞が血管周辺にほとんど局在していたのに対して、CCL27 発現 OV-HM 細胞移植群では腫瘍深部にまで浸潤が認められた。T 細胞の細胞傷害メカニズムから考えると、腫瘍細胞が T 細胞によって傷害されるためには T 細胞が腫瘍細胞に直接接触しなければならない。しかし、CX3CL1 発現 OV-HM 細胞移植群では T 細胞は腫瘍血管周辺に局在しており、腫瘍細胞と直接接触している割合が低かった。そのため腫瘍細胞が傷害されず、腫瘍の増殖を完全に抑制できなかったものと考えられる。

もう一つの違いとしては、CX3CL1 発現 OV-HM 細胞移植群ではコントロール群と比較して血管が発達していたことである。腫瘍においては一般に腫瘍の増殖と免疫反応による傷害が同時に繰り広げられ、腫瘍の増殖退縮の成否はまさにそのバランスによって規定される。血管新生は腫瘍の増殖に必須の現象であり、CX3CL1 は *in vivo* において血管新生促進作用が報告された¹⁷⁾。この事実を考え合わせると、CCL27 と CX3CL1 の抗腫瘍効果の違いは血管新生に与える影響による差であるという可能性も考えられる。

サイトカイン・ケモカイン併用投与によるがん免疫療法の最適化

腫瘍細胞に CCL27 を発現させることにより、がんのエフェクター細胞である T 細胞を腫瘍深部にまで浸潤させることが出来たことから、CCL27 発現 Ad-RGD (Ad-RGD-CCL27) を用いてがん治療実験を行った。まず、OV-HM 担がんマウスの腫瘍内に Ad-RGD-CCL27 を投与したが、顕著な腫瘍増殖抑制は認められなかった。本結果は、すでに生着している腫瘍に対しては、たんに腫瘍内に T 細胞を浸潤させるだけでは十分な抗腫瘍効果が得られないことを示すものである。

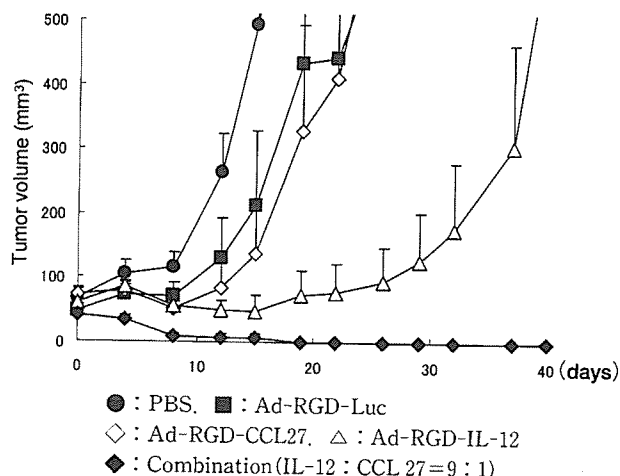


図3 Synergistic anti-tumor effect of Ad-RGD-IL-12 and Ad-RGD-CCL27

B6C3F1 mice were inoculated intradermally with OV-HM cells (1×10^6 cells/mouse). Groups of mice bearing OV-HM tumor nodules inoculated about one week before treatment onset were intratumorally injected with the indicated adenoviruses (in total is 2×10^7 PFU) or PBS. Ad-RGD-Luc was used as negative control. Tumor size was measured twice a week using caliper.

そこで、免疫系細胞を活性化させるサイトカインとして IL-12 を選択し、CCL27 との併用によるがん免疫療法の最適化を試みた¹⁸⁾。その結果、IL-12 発現 Ad-RGD (Ad-RGD-IL-12) 単独投与群 (2×10^7 PFU/mouse) では、腫瘍の増殖が抑制され、7 例中 4 例の完全治癒が得られた。一方、Ad-RGD-IL-12 と Ad-RGD-CCL27 を 9:1 の割合で混合して投与した群では、総投与量が等量 (2×10^7 PFU/mouse) であるにもかかわらず、腫瘍の増殖は完全に抑制され、8 例中全例が完全治癒した (図 3)。この抗腫瘍効果の機構解明を目的にヌードマウスを用いて同様に検討したところ、併用投与群においても抗腫瘍効果は観察されなかった。さらに、CD4、CD8 陽性 T 細胞の両方を除去したマウスでは、コントロール群と同程度以上の腫瘍の増殖が観察された。これらの結果から、今回得られた抗腫瘍効果には、T 細胞が重要な働きをしていることが明らかとなった。

つづいて、腫瘍組織内への T 細胞の浸潤について検討を行ったところ、Ad-RGD-CCL27 単独投与群、および併用投与群において多くの T 細胞が腫瘍内へと浸潤していたことが明らかとなった。さらに、Ad-RGD-CCL27 単独投与群では、主に CD4 陽性 T

細胞が多く浸潤しており、CD8 陽性 T 細胞の浸潤は Ad-RGD-IL-12 単独投与群よりも少なかった。しかし、併用投与群では CD4 陽性 T 細胞のみならず CD8 陽性 T 細胞もともに浸潤していることが明らかとなった。

本結果は、IL-12 によるリンパ球の活性化と CCL27 によるそれら細胞の浸潤という両者を組み合わせることにより、効果的な治療効果が得られることを示したものであり、今後のがん免疫療法において cell delivery system の概念に基づいたアプローチが重要であることを示すものである。

ケモカインレセプターを用いたがん免疫療法

養子免疫療法や LAK 療法、DC ワクチン療法においては、T 細胞や DC などを患者の体内から取り出し、*in vitro* でサイトカインや抗原などで刺激することで疾病治療に有効な機能性細胞へとつくり上げ、それを薬物として患者の体内へと戻すことによる治療である。

しかしながら、これら生きた細胞を薬物として投与しても、その生きた薬物が標的組織である腫瘍組織やリンパ節へ移行する割合がきわめて低いため、十分な治療効果が得られていないのが現状である。そのため効果的な抗腫瘍効果という薬効を発現させるために、少しでも多くの薬物としての細胞を投与しようと試みられている。これは、一般医薬品に置き換えて考えると、医薬品の生体内動態を改善しようとするのではなく、組織移行性に乏しいから大量投与しようとしているのと同じである。

筆者らは、この問題点を克服するにあたってケモカインが有用であると考えている。Huang らは、養子免疫療法として投与する CD8 陽性 T 細胞が発現しているケモカインレセプターを調べ、それに対応するケモカインを腫瘍内で発現させることで、投与細胞の腫瘍移行量が増加し、それに伴い強い抗腫瘍効果が得られることを報告している¹⁹⁾。

また、ケモカインは通常のリンパ球の体内動態制御に関わる分子であり、腫瘍組織においても種々ケモカインが発現していることから、薬物として投与する免疫細胞にそれらケモカインに対するレセプ

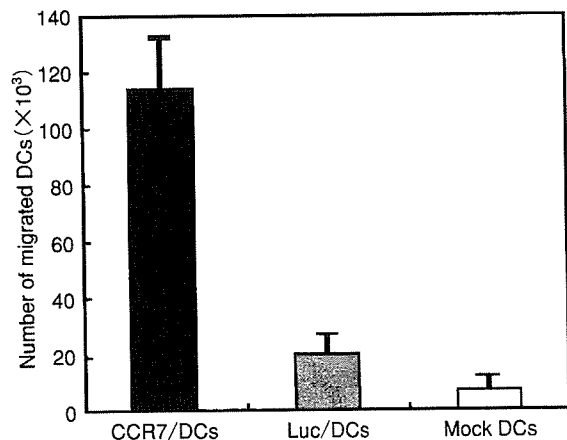


図 4 Migration of CCR7/DCs from administration site to draining lymph node

EGFP-Tg DCs were transduced with Ad-RGD-CCR7 or Ad-RGD-Luc at 50 MOI. These transduced cells and mock DCs were intradermally injected into the left flank of C57BL/6 mice at 2×10^6 cells. After 2 days, the draining lymph nodes were collected from these mice and stained by indirect immunofluorescence using anti-CD11c monoclonal antibody. The abundance of EGFP⁺ CD11c⁺ DCs were assessed by flow cytometric analysis.

ターを発現させれば、腫瘍組織への移行量が増大すると考えられる。これはケモカインレセプターによる免疫細胞の標的組織へのターゲティングであり、現在この点については、レンチウイルスベクターを用いて検討している。

一方筆者らは、DC ワクチン療法においてケモカインレセプターを利用することで、強い免疫反応を誘導することに成功している²⁰⁾。DC は、T 細胞を効率よく活性化しうる細胞であり、T 細胞依存性の獲得免疫応答の開始・増幅、さらには自然免疫応答の制御をも含めた免疫監視機構の司令塔として機能しているプロフェッショナル抗原提示細胞である。

現在行われている DC ワクチン療法は、末梢単核球や単球、骨髓細胞からサイトカイン刺激下で誘導した未成熟 DC に、がん抗原遺伝子や蛋白質を導入したものを患者に投与するというものである。しかしながら、生体に投与した DC が T 細胞を感作・活性化させる場である所属リンパ節へ遊走するのは、投与したうちの 1% 以下であるため、免疫エフェクター細胞の十分な感作・活性化が制限されてしまうという問題点が残されている。

こうしたなか、DC のリンパ組織移行に関する分