

子メカニズムについて、炎症反応に伴って DC に発現誘導されるケモカインレセプター (CCR7) とリンパ組織で恒常的に産生される CCL21 との連関が中心的な役割を果たすことが近年判明した。したがって、薬物として投与する DC に十分に CCR7 を発現させることが出来れば、リンパ組織指向性の DC となり、ターゲティング能を兼ね備えた“生きた薬物”が創製できる可能性がある。

そこで、Ad-RGD を用いて CCR7 を高発現させた DC (CCR7/DCs) を調製し、そのリンパ組織集積性、ならびにワクチン機能について検討した。CCR7/DCs を皮内投与したときの体内動態について解析したところ、コントロールベクター処理 DC と比較して、5.5 倍も多くの DC が所属リンパ節へと送達できていることが明らかとなった (図 4)。すなわち、当初の目的どおり、DC に CCR7 を高発現させることによって、これまで問題となっていたリンパ組織移行性を大幅に改善できることが判明した。また、抗原を共導入した CCR7/DCs では、たんに抗原のみを導入した DC よりも少ない DC 数で効果的な抗腫瘍効果が得られることを確認した。

本結果は、細胞を標的組織であるリンパ節へと積極的に送達させたことによる治療効果の向上であり、まさに cell delivery system を実践したものであるといえる。

おわりに

20 世紀の DDS 研究は低分子有機化合物の体内動態を制御することによる薬物治療の最適化を目指したものであった。本稿では、これまでの低分子有機化合物のみならず、生きた細胞を薬物として捉え、その細胞の体内動態を制御することによるがん免疫療法最適化を目指した筆者らの研究成果について紹介した。この最もインテリジェントな粒子である細胞を薬物として捉えた DDS は、cell delivery system という 21 世紀の新たな DDS の分野を切り拓くものであり、今後この cell delivery system の概念をもとに、がん免疫療法をはじめとする多くの疾病治療法が開発されることを期待している。

本稿で紹介させていただいた成果の一部は、京都薬科大学 山本 昌先生、岡田直貴先生との共同研究により得られたものであり、ここに御礼申し上げます。

文 献

- 1) Iwasaki M, Yu WG, Uekusa Y, Nakajima C, Yang YF et al. : Differential IL-12 responsiveness of T cells but not of NK cells from tumor-bearing mice in IL-12-responsive versus-unresponsive tumor models. *Int Immunol* 12 : 701-709, 2000.
- 2) Zlotnik A, Yoshie O : Chemokines : a new classification system and their role in immunity. *Immunity* 12 : 121-127, 2000.
- 3) Butcher EC : Leukocyte-endothelial cell recognition : three (or more) steps to specificity and diversity. *Cell* 67 : 1033-1036, 1991.
- 4) Springer TA : Traffic signals for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration : the multistep paradigm. *Cell* 76 : 301-314, 1994.
- 5) Butcher EC, Picker LJ : Lymphocyte homing and homeostasis. *Science* 272 : 60-66, 1996.
- 6) Yoshida R, Nagira M, Imai T, Baba M, Takagi S et al. : EBI1-ligand chemokine (ELC) attracts a broad spectrum of lymphocytes : activated T cells strongly up-regulate CCR7 and efficiently migrate toward ELC. *Int Immunol* 10 : 901-910, 1998.
- 7) Fitzhugh DJ, Naik S, Caughman SW, Hwang ST : Cutting edge : C-C chemokine receptor 6 is essential for arrest of a subset of memory T cells on activated dermal microvascular endothelial cells under physiologic flow conditions *in vitro*. *J Immunol* 165 : 6677-6681, 2000.
- 8) Imai T, Nagira M, Takagi S, Kakizaki M, Nishimura M et al. : Selective recruitment of CCR4-bearing Th2 cells toward antigen-presenting cells by the CC chemokines thymus and activation-regulated chemokine and macrophage-derived chemokine. *Int Immunol* 11 : 81-88, 1999.
- 9) Reiss Y, Proudfoot AE, Power CA, Campbell JJ, Butcher EC : CC chemokine receptor (CCR) 4 and the CCR10 ligand cutaneous T cell-attracting chemokine (CTACK) in lymphocyte trafficking to inflamed skin. *J Exp Med* 194 : 1541-1547, 2001.
- 10) Hedrick JA, Saylor V, Figueroa D, Mizoue L, Xu Y et al. : Lymphotactin is produced by NK cells and attracts both NK cells and T cells *in vivo*. *J Immunol* 158 : 1533-1540, 1997.
- 11) Yoneda O, Imai T, Goda S, Inoue H, Yamauchi A et al. : Fractalkine-mediated endothelial cell injury by NK cells. *J Immunol* 164 : 4055-4062, 2000.
- 12) Gao JQ, Tsuda Y, Katayama K, Nakayama T, Hatanaka Y et al. : Antitumor effect by interleukin-11 receptor alpha-locus chemokine/CCL 27, introduced into tumor cells through a recombinant adenovirus vector. *Cancer Res* 63 : 4420-4425, 2003.
- 13) Gao JQ, Sugita T, Kanagawa N, Iida K, Okada N et al. : Anti-tumor responses induced by chemokine CCL19 transfected into an ovarian carcinoma model via fiber-mutant adenovirus vector. (Submitted).
- 14) Okada N, Gao JQ, Sasaki A, Niwa M, Okada Y 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*

- 317 : 68-76, 2004.
- 15) Gao JQ, Alexandre LS, Tsuda Y, Katayama K, Eto Y et al. : Tumor-suppressive activities by chemokines introduced into OV-HM cells using fiber-mutant adenovirus vectors. *Pharmazie* 59 : 238-239, 2004.
 - 16) Mizuguchi H, Koizumi N, Hosono T, Utoguchi N, Watanabe Y et al. : 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.
 - 17) Volin MV, Woods JM, Amin MA, Connors MA, Harlow LA et al. : Fractalkine : a novel angiogenic chemokine in rheumatoid arthritis. *Am J Pathol* 159 : 1521-1530, 2001.
 - 18) Gao JQ, Sugita T, Kanagawa N, Iida K, Motomura Y et al. : Combination with chemokine CCL27 and cytokine IL-12 encoding in fiber-mutant adenovirus vector induced synergistic anti-tumor effect on ovarian carcinoma : both accumulation and activation of immune cells are indispensable for tumor regression. (In preparation).
 - 19) Huang H, Xiang J : Synergistic effect of lymphotactin and interferon gamma-inducible protein-10 transgene expression in T-cell localization and adoptive T-cell therapy of tumors. *Int J Cancer* 109 : 817-825, 2004.
 - 20) Okada N, Mori N, Koretomo R, Okada Y, Nakayama T et al. : Augmentation of the migratory ability of DC-based vaccine into regional lymph nodes by efficient CCR 7 gene transduction. *Gene Ther*, (In press).

細胞性製剤と細胞送達システム (Cell Delivery System)

Cytomedicine and Cell Delivery System

大阪大学大学院薬学研究科¹⁾、神戸学院大学²⁾

中川晋作¹⁾、真弓忠範²⁾

SHINSAKU NAKAGAWA¹⁾、TADANORI MAYUMI²⁾

Graduate School of Pharmaceutical Sciences School of Pharmaceutical Sciences Osaka University¹⁾

The Faculty of Pharmaceutical Sciences, KobeGakuin University²⁾

はじめに

生命体は形態的・機能的に異なるさまざまな細胞から形成されており、これら細胞は巧妙な細胞間情報伝達機構を駆使して相互の調和を保っている。それら高度な機能を有する分化細胞は、未分化細胞から必要な時に、必要な場所で、必要な量だけ産生される。また、それら分化細胞は生命体の内外環境の変化を察知するセンサー機能、この変化に適応するための生理活性物質の生合成機能、生合成された生理活性物質の分泌・徐放機能およびこれら諸機能を調節する制御機能等を有し、必要な時に、必要な部位で、必要な量の生理活性物質を作用させることにより生命体を維持している。この中で驚嘆すべきことは、さまざまな制御の中で、いかにタイミングよく高度に分化した細胞が産生されているか、またいかに見事なタイミングで生理活性物質が細胞内で生合成され、細胞外に分泌・徐放されているかである。

高度に分化した細胞自身ならびにその細胞から産生される生理活性物質を薬物と見立てた場合、細胞は体内でまさしくDDSを実践している粒子であり、機能面からいえば細胞に勝る製剤素材はない。現在、地球上に存在する最もインテリジェントな粒子は細胞である。人類は依然として人工的に細胞を創ることはできない。細胞を人工的に自由に創り得ないのであれば、せめてそれが成功するまでの永い期間は、「天から与えられた細胞」が隠し持つ潜在能力を最大限利用し、生きた細胞そのものを製剤化した「細胞性製剤」とも呼ぶべき剤形による疾病治療(細胞療法)の実現に向けて邁進するのが薬学を志す者の面目であろう。

細胞を用いる治療として、その細胞が、①種々の生理

活性物質を必要な時に生合成し、必要な量を細胞外へ分泌・徐放することによる治療、②細胞間接着による細胞間認識により、他の細胞の機能を向上させることによる治療、あるいは病態細胞に直接作用することによる治療などが考えられる。これら細胞性製剤を用いたいずれの治療においても、安全かつ有効な細胞療法を展開するためには、生きた細胞を薬物として捉えた“細胞送達システム(Cell Delivery System)”ともいべきDDS概念が重要になってくる。

本稿では、細胞療法の最適化を目指したCell Delivery Systemに関するわれわれの取り組みについて概説する。

1. 機能性細胞の体内動態制御

細胞性製剤として疾病治療に用いる機能性細胞としては、(A)自己の細胞を含め組織適合性抗原が患者に適合している細胞を用いる場合と、(B)適合していない非自己の細胞を用いる場合に分類できる。前者の例としては、すでに骨髄移植という形で治療が行われている。また、その他にも胎児から分離されたドーパミン産生細胞やインスリン分泌能を有する膵臓のランゲルハンス島等が、冒頭で述べた①の治療として臨床応用されている。また、②の治療としては、免疫細胞を用いた癌治療があり、LAK(lymphokine-activated killer)療法¹⁾や腫瘍組織内浸潤リンパ球(tumor-infiltrating lymphocytes : TIL)療法²⁾、樹状細胞(Dendritic Cell : DC)療法^{3, 4)}等が検討されている。

このような中でわれわれは、薬物として働く機能性細胞の生体内安定性や体内動態を制御するCell Delivery Systemの概念に基づく癌免疫療法の最適化を試みている。DCは、T細胞を効率よく活性化し得る細胞であり、

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。近年、DCの単離・培養技術が確立され、そのDCに腫瘍関連抗原(tumor-associated antigen; TAA)遺伝子やタンパク質を導入することで、効果的な腫瘍免疫誘導を達成しようとするさまざまなDCワクチン療法が試みられている。われわれもDCに効率よく遺伝子導入できるアデノウイルスベクターを用いて効果的なDCワクチン療法の確立を目指している⁵⁻⁷⁾。一般的にTAAが導入されたDCは、成熟し細胞表面にMHC分子とともにその抗原情報を提示する。DCワクチン療法では、このDCを「薬物」として投与する(図1)。投与されたDCは、輸入リンパ管や血管を介して最寄りのリンパ組織へと遊走する。そしてリンパ組織に到達した成熟DCが、抗原特異的にnaive T細胞を感作・活性化することにより、T細胞依存性の初期免疫応答を惹起する。すなわちDCワクチン療法は、*in vitro*でTAAを導入したDCを「薬物」として捉え、その「生きた薬物」を生体に投与することによって、DC支配下の一連の免疫応答を効果的に活性化し、最終的にTAA特異的エフェクター細胞による癌細胞の排除を目指すものである。しかしながら、このDCワクチン療法では、投与したDCの大半が細胞死(アポトーシス)を引き起こすため、生体内における生存率が乏しく、結果として標的組織である所属リンパ節へ遊走するDCは投与したうちの1%以下である。そのため、免疫エフェクター細胞の十分な感作・活性化という薬効発現が制限されてしまうという問題が生じている^{8,9)}。そこで効果的な免疫誘導という薬効を発現させるために、少しでも多くの「生きた薬物」としてのDCを投与しようとする考えがある。しかしこれは、一般医薬品に置き換えて考えると、薬物の生体内安定性および標的組織指向性が乏しいために、それら問題点を改善しようとするのではなく、ただ単に不安定なまま、あるいは体内動態を改善しないまま大量投与しようとしていることと同じである。われわれは、DCに抗アポトーシス活性を有するBcl遺伝子を導入し、「生きた薬物」であるDCの生体内での生存性/安定性を高めることにより、高いワクチン活性を得ることに成功している。また、リン

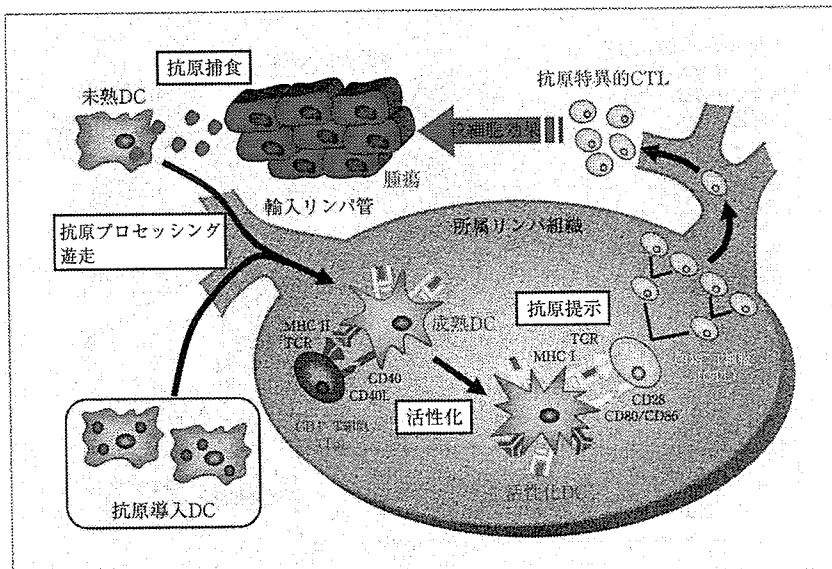


図1 樹状細胞(DC)の免疫学的機能とDC癌免疫療法

パ組織への遊走を担うケモカインレセプターをDCに高発現させることにより、リンパ組織への移行率/標的指向性が上昇し、結果として免疫誘導能を増強させることにも成功している¹⁰⁾。これらの結果は、生きた薬物としての細胞に、生体内安定性および標的組織指向性を付与する広義のDDSの概念、すなわち、細胞送達システム(Cell Delivery System)を導入することで、一般薬と同様に効果増強を達成できることを示した例である。

また、癌免疫療法において癌細胞の排除に中心的な役割を果たすのは、細胞傷害性T細胞やナチュラルキラー細胞、マクロファージ等の癌細胞傷害性免疫担当細胞群である。これら免疫系の細胞がバランスよく活性化され、抗腫瘍活性を獲得したうえで、腫瘍組織へ浸潤することにより、強い抗腫瘍効果が誘導されることになる。したがって、サイトカイン等により免疫系細胞群を活性化させ、抗腫瘍効果を得ようとする癌免疫療法においては、「投与する免疫賦活化剤をいかにしてこれらの細胞に効率よく作用させるか」を目指したDDS研究が従来から行われていた。しかしながら、一部の癌種ではサイトカインの投与により免疫系細胞群が活性化され、強い抗腫瘍効果が得られているものの、一方で免疫系細胞が活性化されているにもかかわらず、腫瘍組織には浸潤せず、腫瘍が退縮しないというケースが存在する。この事実と、多くの腫瘍のほとんどがリンパ球非浸潤性、または低浸潤性であることを考え合わせると、癌免疫療法において、リンパ球の腫瘍局所への浸潤/標的指向性がいかに重要であるかが容易に予想できる。われわれは、これまでに行われてきたサイトカイン等により免疫担当細胞群

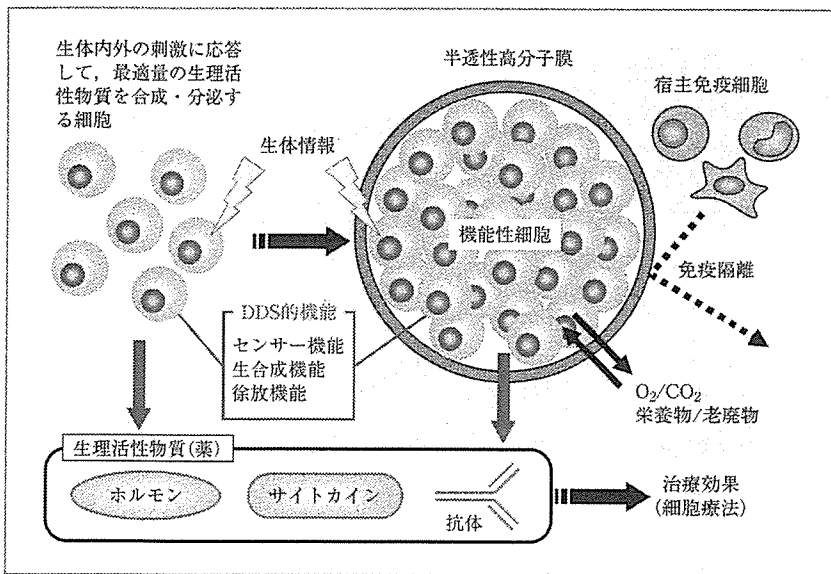


図2 機能性細胞封入マイクロカプセル(細胞性製剤)

を効果的に活性化させるDDSに加えて、活性化された癌細胞傷害性免疫担当細胞群の動態を制御して、それら細胞自身を標的部位(癌組織)に効果的に送達させるというDDSの概念を導入することによる効果的な癌免疫療法の最適化を試みている。これまでに抗腫瘍活性を有するリンパ球に対して遊走活性を示すケモカインを腫瘍細胞に発現させることで、腫瘍組織内へのリンパ球浸潤が上昇し、それに基づき強い抗腫瘍効果が得られることを報告している¹¹⁻¹³⁾。これらの結果は、最終的に治療効果を発揮する細胞を標的部位(癌組織)へ送達させることの重要性を示したものである。

以上のようにCell Delivery Systemの概念は、その細胞から分泌される生理活性物質によって疾病治療を期待する機能性細胞を細胞性製剤として投与する細胞療法だけに限らず、サイトカイン療法のように生体内で機能している細胞の動態を制御することによる疾病治療の最適化をも含んでいる。

2 機能性細胞の免疫隔離

遺伝子導入等により、人工的に新たな機能が付与された機能性細胞を体内に適用した時、そのままの状態では生体内環境に適応して安定に機能し、疾病治療に有効であればこれ以上何ら手を加える必要はない。細胞性製剤として、直接、生体内に投与すればよいことになる。しかしこの場合の細胞は、自己あるいは組織適合性抗原が患者に適合している細胞に限られることになる。したがって、莫大な多様性を有するオーダーメイド治療の域を超えることはできず、現在のところ一般的な治療法にはな

りにくい。将来的に機能性細胞を自己の細胞から調製するのではなく、広く非自己の細胞をも利用でき得ようになれば、応用範囲は著しく拡大し、一般の製剤として適応することができ、21世紀の新たな医療として大きく発展する可能性がある。非自己の機能性細胞を細胞性製剤として疾病治療に適用するためには、宿主の免疫系から完全に回避して拒絶反応を防ぎ、体内で安定に機能させる方法を開発する必要がある。この方法として冒頭の①、すなわち細胞から分泌される生理活性物質により疾病を治療しようとする場合には、図2に示すように細胞を高分子膜で包み込み、免疫担当細胞をはじめと

する生体防御因子の進入を防ぐことができれば、この機能性細胞は生体の拒絶反応を回避してカプセル内で生存することが可能になる¹⁴⁻¹⁶⁾。この場合、用いる高分子膜は細胞の生存に必要な栄養や酸素、生体内情報伝達物質の透過および細胞からの生理活性物質や老廃物の排出が良好な膜でなければならない。さらには生体内で長期間安定で、生体適合性にも優れている等の条件を満たす必要がある。以上の条件を満たせば自己、非自己を問わず機能性細胞が生存し続ける限り、センサー機能・制御機能等を維持したまま、生合成機能により薬物としての生理活性蛋白質を産生し徐放する、つまり、必要な時に、必要な量の薬物を放出する極めてインテリジェントな細胞性製剤として機能してくれるはずである。われわれは、細胞保護カプセルとしてアルギン酸とポリ(L)リジンのイオンコンプレックスで作製したAPAマイクロカプセルを選択し、細胞性製剤としての可能性を検討してきた¹⁵⁻¹⁷⁾。これまでに糖尿病モデルマウスに対して、生理的グルコースセンサー機能を有し、グルコース濃度に応じてインスリンを分泌する膵臓β細胞をそのAPAマイクロカプセルに封入した細胞性製剤が、1回の投与で疾病治療に極めて有効に機能することを報告している¹⁸⁾。本研究は、生きた細胞を薬物として捉えて製剤化し、その細胞性製剤を疾病治療に適応するためのCell Delivery System研究と言える。

おわりに

従来からの病態改善・治療を目的とした臓器移植や輸血は、薬学的観点からすると細胞性製剤の源流であった

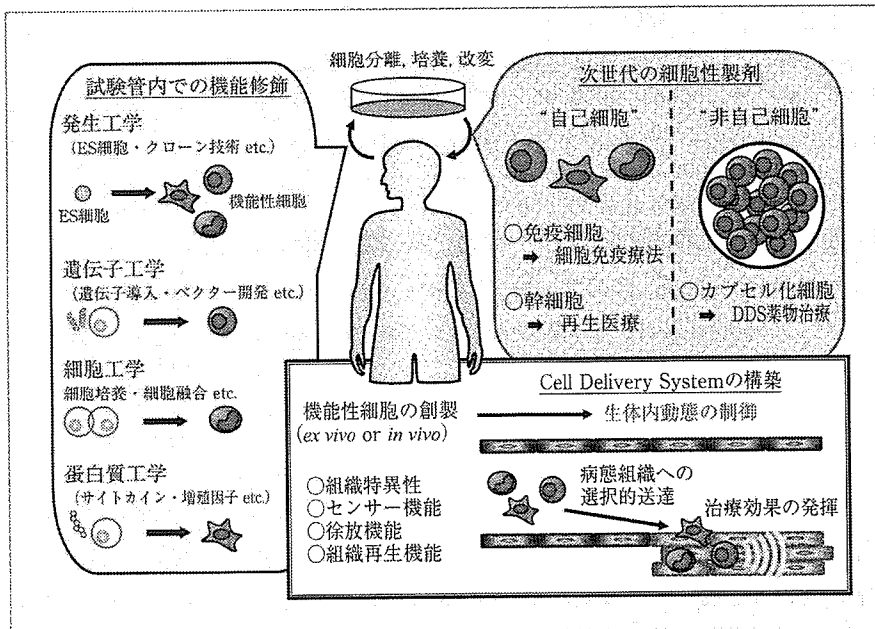


図3 Cell Delivery Systemによる細胞療法の最適化

と言えよう。例えば輸血は、まさしく生きた細胞の水性懸濁剤に他ならない。臓器移植や輸血の場合は、健康人である他人の体内に存在した臓器/組織/細胞や血球細胞(血液)等を*in vitro*に取り出し、元の機能を何ら変化させることなく製剤化したものである。このように体内から取り出した細胞を、元の状態のまま機能変化させることなく製剤化したものを第一世代の細胞性製剤と呼ぶならば、個々の病態に対応したセンサー機能、生合成機能、徐放機能、制御機能等を新たに付与した機能性細胞を、遺伝子工学や細胞工学などの技術を駆使して作製した後、この細胞を素材として製剤化したものは、次世代の細胞性製剤と位置付けることができる(図3)。この新しい細胞性製剤は、前述の通り、カプセルに封入した剤形と生きた細胞の水性懸濁剤等が考えられる。21世紀におけるDDSは、本来、物質としての薬物に対して「必要な時に、必要な場所に、必要な量の薬物を送達する」という新たな付加価値を付与することによって最適薬物治療を行おうとするものであった。しかし、21世紀医療においては、必要な時に、必要な量の生理活性物質を生合成し、分泌する細胞それ自体を薬物概念に包含し、この細胞自体(あるいは、細胞を封入したカプセル自体)が必要な場所に標的指向させることが求められるであろう。この“細胞送達システム(Cell Delivery System)”が可能となれば、細胞から生合成・分泌される「必要な時に、必要な量の」生理活性物質による疾病治療の最適化がもたらされるだけでなく、機能性細胞が有する細胞-細胞間

応答などの多様な機能を介した疾病治療の最適化をも可能となってくる。細胞性製剤は無数の可能性を有している。

参考文献

- 1) Rosenberg, S. A., Lotze, M. T. et al: J. Natl. Cancer Inst. **85**, 622-632(1993)
- 2) Rosenberg, S. A., Packard, B. S. et al: N. Engl. J. Med. **319**, 1676-1680 (1988)
- 3) Hsu, F. J., Benike, C. et al: Nat. Med. **2**, 52-58(1996)
- 4) Reichardt, V. L., Okada, C. Y. et al: Blood **93**, 2411-2419 (1999)
- 5) Okada, N., Tsukada, Y. et al: Biochem. Biophys. Res. Commun. **282**, 173-179(2001)
- 6) Okada, N., Saito, T. et al: Cancer Res. **61**, 7913-7919(2001)
- 7) Okada, N., Masunaga, Y. et al: Gene Therapy **10**, 1891-1902 (2003)
- 8) Lappin, M. B., Weiss, J. M. et al: Immunology **98**, 181-188 (1999)
- 9) Martin-Fontecha, A., Sebastiani, S. et al: J. Exp. Med. **198**, 615-621(2003)
- 10) Okada, N., Mori, N. et al: Gene Therapy **12**, 129-139(2005)
- 11) Gao, J.Q., Tsuda, Y. et al: Cancer Res. **63**, 4420-4425(2003)
- 12) Gao, J.Q., Alexandre, L.S. et al: Pharmazie **59**, 238-239(2004)
- 13) Okada, N., Gao, J.Q. et al: Biochem. Biophys. Res. Commun. **317**, 68-76(2004)
- 14) Okada, N., Miyamoto, H. et al: J. Controlled Release **44**, 195-200(1997)
- 15) Okada, N., Miyamoto, H. et al: Biochim. Biophys. Acta. **1360**, 53-63(1997)
- 16) Okada, N., Miyamoto, H. et al: Biochem. Biophys. Res. Commun. **230**, 524-7(1997)
- 17) Suzuki, R., Okada, N. et al: Life Sciences **71**, 1717-1729 (2002)

機能性細胞の創製と Cell Delivery System

吉川友章 真弓忠範 中川晋作

はじめに

生命体は形態的・機能的に異なるさまざまな細胞から構成されており、これら細胞は巧妙な細胞間情報伝達機構を駆使して相互の調和を保っている。それら高度な機能を有する分化細胞は、必要な時に、必要な場所で、必要な量だけ未分化細胞から分化する。またその分化した細胞は、生命体の内外環境の変化を察知するセンサー機能を有し、必要なときに、必要な部位で、必要な量の生理活性物質を作用させることにより生命体を維持している。この高度に分化した細胞自身ならびにその細胞から産生される生理活性物質を薬物と見立てた場合、細胞は体内でまさしくDrug Delivery System (DDS) を実践している粒子であり、機能面において細胞に勝る製剤素材はない。したがって、治療に適した機能性細胞を薬物として捉えた細胞療法は、理想的な究極の治療法へと発展していく可能性を秘めている。薬学的観点に立つと、この方法による剤形は「細胞性製剤」とも呼ぶべきものである。また安全かつ有効な細胞療法を行うためには、疾病治療に働く薬としての機能性細胞を創製し、それを「細胞性製剤」として生体に適用するための“Cell Delivery System”ともいふべきDDS概念が重要になってくる。本稿では、細胞療法における機能性細胞の創製とCell delivery systemに関するわれわれの取り組みについて概説する。

機能性細胞の創製

細胞の分離・加工・培養技術が進歩したことにより、樹状細胞 (DC) やT細胞などを用いた細胞免疫療法や、ほとんどすべての細胞に分化・増殖させることが可能な胚性幹細胞 (ES細胞)、骨髄・体性幹細胞を用いた再生医療・細胞治療が注目されており、現在ではさまざまなベンチャー企業が参入している (表)。例えば、ジェロン社はヒトES細胞に複数の成長因子を作用させて心筋細胞、骨芽細胞、膵臓β細胞など、さまざまな細胞に分化させる技術の開発に成功しており、細胞療法への実用化をめざしている。また、エキサイトセラピーズ社は、抗原で表面を修飾した微粒子 (人工抗原提示細胞) を用いた独自のT細胞活性化法を開発し、患者のT細胞を用いた腫瘍免疫療法への展開を計画している。これらは、発生工学や細胞工学的手法により機能性細胞を作製・利用した細胞療法の一例である。一方、岡田らはDCに対して高効率で遺伝子導入可能な改変型アデノウイルスベクター (Ad) を用いて機能性DCを作製し、このDCを細胞性製剤として捉えたDCワクチン療法の最適化に取り組んでいる。Adは、現存する遺伝子導入ベクターの中で最高の遺伝子導入効率を誇っているが、DCや一部のリンパ球などに対しては導入効率が悪い。この点について、遺伝子導入時にウイルス粒子と細胞との接着に関与する外殻タンパク質の一部に、接着分子 (インテグリン) と高い親和性を有するRGDモチーフを導入したAd (AdRGD) が、従来型のAd

に比べて遺伝子発現効率・遺伝子導入効率共に著しく高いことを見出したり、このAdRGDを用いることでDCにおいて抗原遺伝子の高い発現が可能となり、*in vivo*へ適用した場合、従来型のAdを用いた場合と比較して顕著な腫瘍特異的免疫応答が誘導された²⁾。本結果は、癌患者末梢血より単離・分化誘導したDCを有効に利用し、かつ効果的な免疫応答を惹起することができる機能性細胞 (細胞性製剤) を創り出すという観点から、DC免疫療法において非常に有用性の高いベクターシステムであると考えられる。また、われわれは遺伝子だけでなく、機能性核酸や抗原タンパク質さらには機能性ナノ粒子など、リポソームに封入可能な物質をほぼすべての動物細胞の細胞質内へ効率的かつ簡単に導入できる膜融合リポソームを開発した³⁾。この技術を駆使して癌抗原タンパク質や抗原ペプチドを抗原提示細胞の細胞質内へ導入することで、細胞傷害性T細胞を効率よく誘導できる抗原提示細胞を創り出すことができ、効果的なワクチン療法が達成できることを明らかにしている⁴⁾⁵⁾。

以上、細胞内に遺伝子や生理活性物質を導入して新たな機能性細胞を創り出す技術の開発は、今後ますます発展し、それに伴い細胞療法への展開が飛躍的に拡充していくものと思われる。

細胞療法の最適化を目指したCell delivery system技術の開発

疾病治療に有効な機能性細胞を「細胞性製剤」として生体に適用するにあたり、



表 細胞療法に参入している主なベンチャー

アイソティス社	繊維芽細胞 ケラチン細胞	糖尿病性皮膚潰瘍	Phase II
アイソラージェン社	繊維芽細胞	やけど、しわ、にきび跡	Phase III
インターサイテックス社	繊維芽細胞 毛根細胞	糖尿病性皮膚潰瘍 自己毛根細胞の増殖	Phase I
ゾーンベック社	心筋細胞	心筋梗塞	Phase I
ジェンザイム・バイオ	表皮細胞	火傷治療	販売中 (Epicel)
サージェリー社	軟骨細胞	関節軟骨損傷治療	販売中 (Carticel)
チタン・ファーマ	ドーパミン産生ヒト網膜色素上皮細胞	パーキンソン病	Phase II
シューティカルズ社			
ジェネティクス・	MDR遺伝子導入造血幹細胞	癌治療	Phase II
ファーマシューテカルズ社	(レトロウイルスベクター)		
イムン・レスポンス社	IL-2, GM-CSF遺伝子導入 繊維芽細胞	癌ワクチン	Phase I
セレジーン社	NGF遺伝子導入繊維芽細胞	アルツハイマー病治療	Phase I
ニューロテック社	NT-501, CNTF遺伝子導入 網膜上皮細胞 (半透性カプセルに封入)	色素性網膜炎治療	Phase I
ウイルキス社	抗HIVアンチセンス導入T細胞 (レンチウイルスベクター)	エイズ治療	Phase I
エキサイト・セラピーズ社	T細胞 [患者の血液から分離したT細胞をマイ クロビーズ (人工抗原提示細胞) で活性化]	癌治療	Phase I
セレキス社	T細胞 (抗原特異的T細胞の迅速増殖法)	エイズ, メラノーマ治療	Phase I
デンドレオン社	樹状細胞 (樹状前駆細胞をAntigen Delivery Cassetteで刺激)	癌治療	Phase III
ノースウェスト・バイオ	患者由来樹状細胞	癌治療	Phase II (休止中)
セラピューティクス社			
ジェンザイム・オンコロジー社	樹状細胞と癌細胞の融合細胞	癌治療	Phase I / II
アーストローム社	骨髄幹細胞, 抗原ペプチドパルス樹状細胞	癌化学療法後の血球, 免疫の維持 (自己骨髄移植)	販売中
イキシオン・バイオテクノロジー社	成人すい管細胞	1型糖尿病治療	Phase II
オサイリス・セラピューティクス社	間葉系細胞	骨髄移植	Phase II
キュリス社	成人幹細胞	1型糖尿病治療	-
ジェロン社	ES細胞	虚血性心疾患, 骨粗しょう症治療	-
ステムセルズ社	神経幹細胞	アルツハイマー病治療	前臨床
セルジェニクス社	幹細胞	患者特異的ワクチン	Phase I

日経バイオビジネス2004年7月号より改変

一般薬物におけるDDSと同様、細胞療法における「細胞性製剤」の投与形態並びに投与後の体内動態を制御する新たなCell Delivery System技術の開発 (図) が必要である。

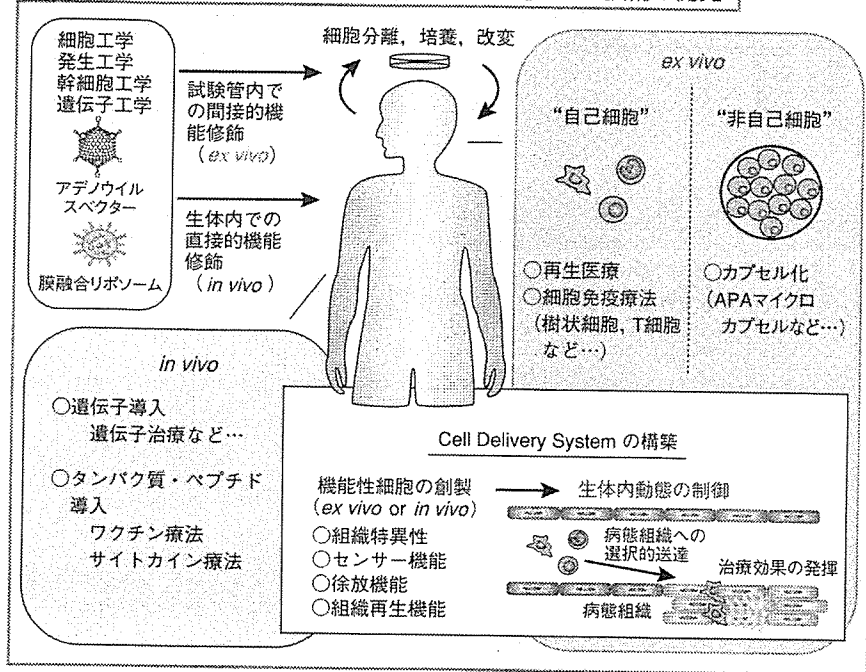
遺伝子導入などにより新たな機能が付与された機能性細胞や多分化能を有する幹細胞などを生体に適用するとき、そのままの状態では疾病治療に有効であればこれ以上何ら手を加える必要はなく、細胞性製剤として直接生体内に投与すればよい。しかしこの場合の細胞は、自己あるいは組織適合性抗原が患者に適合している細胞に限られる。将来的に機能性細胞あるいは幹細胞を自己の細胞から調製するのではなく、広く非自己の細胞をも利

用できうようになれば、応用範囲は著しく拡大することになる。非自己の機能性細胞を細胞性製剤として疾病治療に適用するためには、宿主の免疫系から完全に回避して拒絶反応を防ぎ、体内で安定に機能させる方法を開発する必要がある。われわれは、免疫担当細胞をはじめ生体防御因子の進入を防ぐことができる高分子膜で機能性細胞を包埋することにより、同種異系細胞でも適応可能な細胞性製剤の開発を行っている⁶⁾。これまでにアルギン酸とポリ (L) リジンのイオン複合体で作製したAPAマイクロカプセル内に、生理的グルコースセンサー機能を有し、グルコース濃度に応じてインスリンを分泌する膵臓β細胞を封

入した「細胞性製剤」を作製し、その糖尿病治療薬としての有効性を検討してきた。この「細胞性製剤」を本細胞とアロジェニックな関係の糖尿病モデルマウスの腹腔内に投与した結果、血糖値が厳密に制御され、致命的な低血糖を招くことなく1回の投与により長期間に渡る糖尿病治療が達成された⁷⁾。本研究は、細胞性製剤の臨床応用に向けた問題点の一部を解決するCell Delivery Systemを提示したものであり、これら技術の蓄積により夢の細胞療法の実現につながるだろう。

さらにわれわれは、薬物として働く機能性細胞の体内動態を制御することによる癌免疫療法の最適化を試みている。抗腫瘍免疫応答の第一段階は腫瘍局所で癌

図 細胞性製剤の投与形態とCell Delivery System技術の開発



には、乗り越えなければならないハードルがいくつもあることは言うまでもない。目的作用を増強した機能性細胞の創製と、これら機能性細胞を「細胞性製剤」として目的の作用部位へ送達するためのCell Delivery Systemの開発が、より確かな細胞療法や再生医療を実現するための一助となることを期待する。

参考文献

- 1) Okada, N. et al. : Biochem. Biophys. Res. Commun., 282 : 173-179, 2001
- 2) Okada, N. et al. : Cancer Res, 61 : 7913-7919, 2001
- 3) Nakagawa, S. et al. : Drug Metabol. Pharmacokin., 18 : 223-229, 2003
- 4) Kunisawa, J. et al. : J. Immunol., 167 : 1406-1412, 2001
- 5) Kunisawa, J. et al. : Adv. Drug Deliv. Rev., 52 : 177-186, 2001
- 6) Okada, N. et al. : Biochem. Biophys. Res. Commun., 230 : 524-527, 1997
- 7) Suzuki, R. et al. : Life Sci., 71 : 1717-1729, 2002
- 8) Okada, N. et al. : Biochem. Biophys. Res. Commun., 317 : 68-76, 2004
- 9) Gao, J. Q. et al. : Cancer Res, 63 : 4420-4425, 2003
- 10) Okada, N. et al. : Gene Ther., in press, 2004

細胞療法の将来展望

本稿で述べたように、今日では数多くのベンチャー企業が細胞療法の開発に参入しその実現に大きな期待が寄せられている。しかし、細胞を使った治療法はまだ開発途上の技術であり、従来の製薬企業で扱える一般的な医薬品とするため

抗原を取り込んだDCのリンパ臓器への遊走である。その後、リンパ臓器でDCからの抗原感作を受け、活性化したT細胞が腫瘍局所へ浸潤し、T細胞による直接的な癌細胞の排除が起こる。しかし、生体内で目的組織（DCの場合はリンパ組織、T細胞の場合は癌組織）に到達する細胞はごく一部であるため、癌免疫療法の実用化のためには、薬としてのDCやT細胞などのリンパ球を標的組織へ効果的にデリバリーすることが重要となる。われわれは、抗腫瘍エフェクター細胞として働く免疫系細胞に対して遊走活性を示すケモカインを腫瘍細胞に発現させることで、腫瘍組織内へのリンパ球浸潤が上昇し、それに基き強い抗腫瘍効果が得られることを報告した⁸⁾⁹⁾。また岡田らは、リンパ組織への遊走を担うケモカインレセプターをDCに高発現させることで、リンパ組織への移行率が上昇し、結果として免疫誘導能が増強されたことを報告している¹⁰⁾。現在、われわれは先に述べたようなさまざまなベクターシステムを駆使し、疾病治療に有効なDCやT細胞を用いたCell Delivery Systemによる癌免疫療法の最適化を試みている。



吉川友章 (よしかわともあき)

神戸大学農学部卒業後、大阪大学大学院薬学研究科薬剤学分野（真弓忠範大阪大学名誉教授）入学、分子生物学、細胞生物学など研究の基礎を学ぶ、同講座博士後期課程2年在学中。研究テーマは、ナノ粒子を応用した抗レトロウイルスワクチン（CREST）、樹状細胞を用いた新規細胞免疫療法の開発であり、中川晋作助教の下で進行中。DDS、ナノテク、細胞医療などに興味を持ち、医学・薬学・工学など複数領域の連携・融合による創薬技術の開発をめざしている。

真弓忠範 (まゆみただのり)

神戸学院大学学長・大阪大学名誉教授。

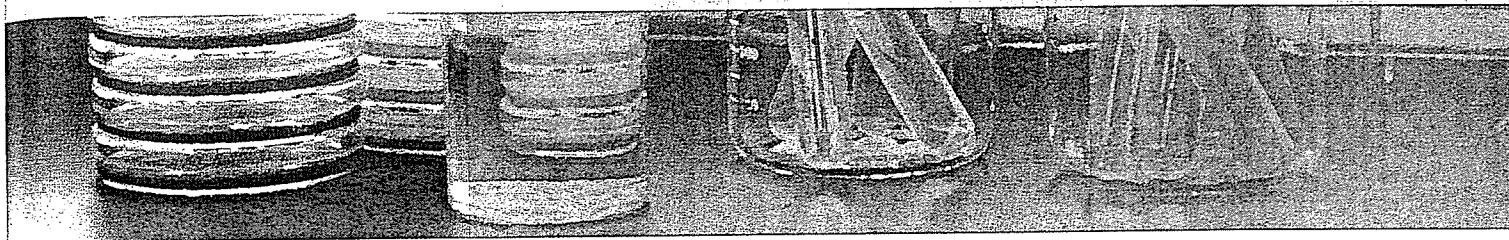


中川晋作 (なかがわしんさく)

大阪大学大学院薬学研究科薬剤学分野助教。1959年生まれ。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）中央研究所勤務、神戸学院大学薬学部助手、大阪大学薬学部助手、講師、The Toronto Hospital Research Institute研究員などを経て現職。1993年より真弓忠範大阪大学名誉教授（現：神戸学院大学学長）の下、遺伝子や細胞を用いた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。

目的遺伝子の抑制レベルを自由に制御する アデノウイルスベクターの開発

水口裕之



はじめに

従来の遺伝子治療や遺伝子導入による実験系は、多くの場合、目的（治療用）遺伝子の過剰発現に基づいたものであった。一方近年、21～29塩基長の短鎖の二本鎖RNA（small interfering RNA：siRNA）によって配列特異的に標的遺伝子の発現を抑制するRNA干渉（RNA interference：RNAi）が注目されており、目的遺伝子の発現を抑制することによって、治療や遺伝子の機能解析を行う研究が盛んに行われている。RNAiについての基本的な特徴・性質についての解説は、多くの総説等がすでに出版されているのでここでは割愛させていただくが、合成siRNAやsiRNAを発現するベクターをいかに目的の細胞に導入するかというデリバリーの問題が、RNAiを利用した研究を行ううえで大きな課題の1つとなっている。

合成siRNAのデリバリーは、リポソームなどのトランスフェクション試薬を用いる方法が一般的である。一方、U6やH1、tRNAなどのRNAポリメラーゼⅢ系のプロモーターにヘアピン型RNA（short hairpin RNA：shRNA）を発現するベクター（siRNA [shRNA] 発現ベクター）は、プラスミドベクターやウイルスベクターに搭載して利用することができる。プラスミド

ベクター（非ウイルスベクター）を用いて遺伝子導入する場合には、遺伝子導入効率にかかわる問題があるため（遺伝子導入効率が低いため）、遺伝子導入された細胞を、薬剤耐性遺伝子やGFP遺伝子を用いて選択しなければ、細胞集団全体としての遺伝子発現抑制効果は観察されないことが多い。一方、ウイルスベクターを用いた場合は、多くの細胞種で100%に近い遺伝子導入効率が期待できるため、遺伝子導入細胞を選択する必要がなく、効率よく遺伝子の機能阻害研究を行うことができる。

ウイルスベクターを用いたRNAi研究には、レトロ・レンチ・アデノウイルスベクターが汎用されている。レトロ・レンチウイルスベクターは1～数コピーの遺伝子が標的細胞の染色体に組込まれるため安定細胞株の作製に適している。この場合、コピー数が少ないので、siRNAのターゲット配列の検索の際には、“よく効く”配列を選択する必要がある。一方、アデノウイルスベクターは1～数十コピーの遺伝子を染色体外DNAとして細胞核内に導入でき、一過性の遺伝子発現を示す。また、高タイトルのウイルス液の調製が容易であり、動物個体への遺伝子導入に適している。これらのウイルスベクターは、感染域も異なっており、研究目的、用いる細胞等に応じて、適したベクター系

Regulated gene silencing by using adenovirus vectors

Hiroyuki Mizuguchi : Laboratory of Gene Transfer and Regulation, National Institute of Biomedical Innovation (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) E-mail : mizuguch@nibio.go.jp

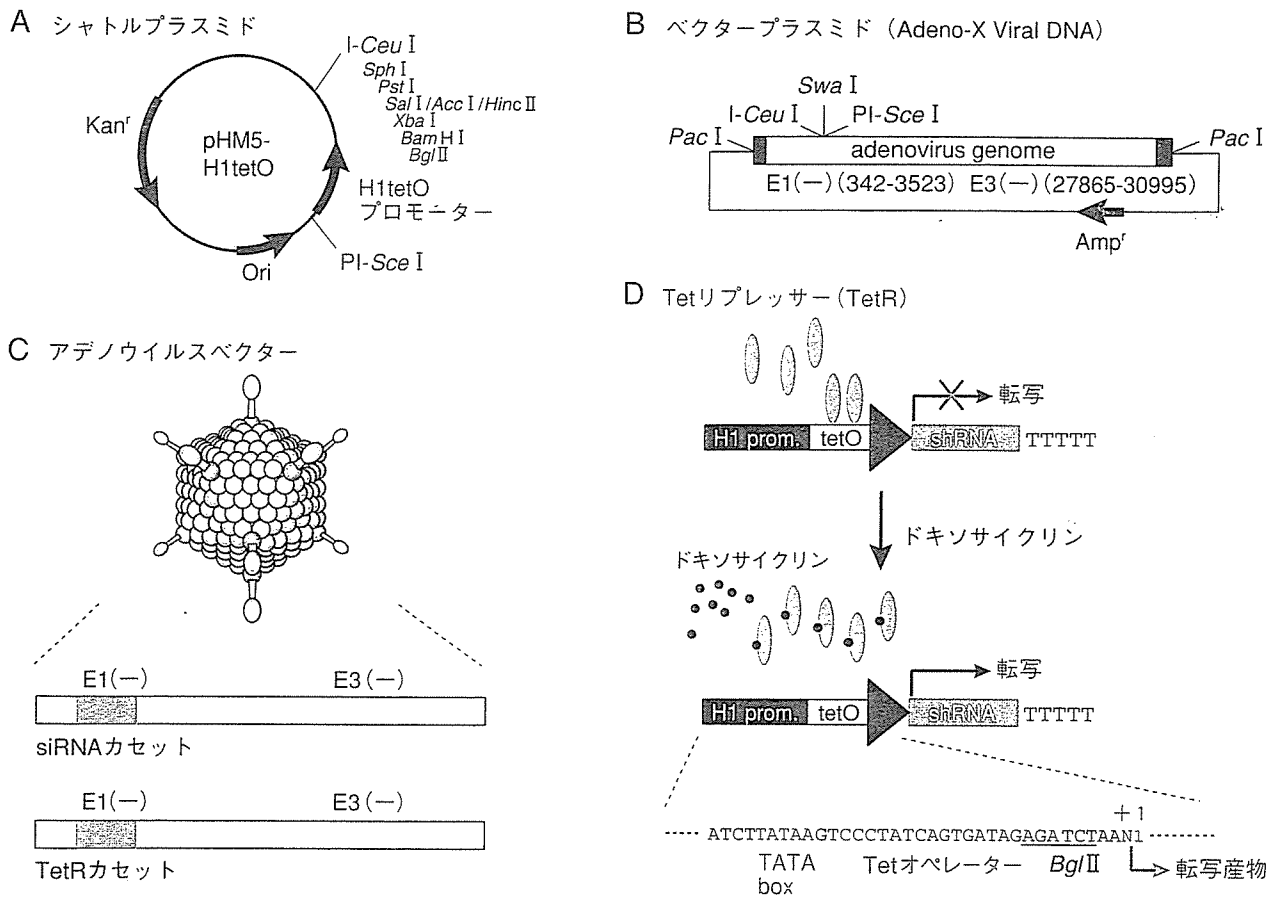


図1 発現制御型 RNAi の原理と各種ベクター

A) シャトルプラスミド, B) ベクタープラスミド, C) アデノウイルスベクター, D) 発現制御型 RNAi の原理. (注) D) における *Bgl* II 部位以下の配列にはシャトルプラスミド pHM5-H1 tetO の配列を示した. 本文中のプロトコールに従って標的配列オリゴヌクレオチドを挿入した場合は, *Bgl* II 部位は消失し, 以下ようになる [AGATCTAA (N1) → AGATCCCC (N1)]. また, ドキシサイクリンはテトラサイクリンの誘導体である

を使用することが重要である. 遺伝子の機能解析を目的とした各種遺伝子導入ベクターの特徴については, われわれの過去の総説を参照していただきたい¹⁾.

一方, siRNA の発現レベルを外的に加えた薬剤などにより制御できれば, 目的遺伝子の発現抑制のレベルを調節することができ, 用量反応に基づいた遺伝子の機能解析が可能になるなど, RNAi 技術は生命科学におけるより強力な基盤技術となる. 本稿では, アデノウイルスベクターとテトラサイクリン (Tet) による発現調節機構を利用して, 目的遺伝子の抑制レベルを自由に制御する実験法について概説する²⁾.

原理

外来遺伝子の発現レベルを薬剤により調節する発現系としては, Tet による発現調節機構を利用した方法

が最も広く用いられている. Tet の遺伝子発現制御系は, プロモーター制御タンパク質と Tet 応答性プロモーターの相互作用が重要な要素になっており, 大別して以下の 2 種類の制御系が知られている.

①プロモーター制御タンパク質として Tet リプレッサータンパク質 (TetR) とヘルペスウイルス由来の VP16 活性化ドメインの融合タンパク質を利用する制御系. Tet 非存在下で Tet オペレーター配列への結合能を有する融合タンパク質 tTA (tetracycline-responsive transcriptional activator) を利用する tet-off 系 (Tet 存在下で Tet 応答性プロモーター制御下の目的遺伝子の転写が off になる) と, Tet 存在下で Tet オペレーター配列への結合能を有する融合タンパク質 rtTA (reverse tetracycline-responsive transcriptional activator) を利用する tet-on 系 (Tet 存在下でテトラサイクリン応答性プ

ロモーター制御下の目的遺伝子の転写がonになる)に分けられる。これらの制御系はクロンテック社より Tet-On & Tet-Off 遺伝子発現系としてキット化されている。

- ②プロモーター制御タンパク質として TetR だけを利用する制御系。Tet 非存在下では TetR のホモダイマー 2 分子が Tet オペレーター配列に結合し、目的遺伝子の転写を抑制するが、Tet 存在下では TetR は Tet オペレーター配列に結合できず、転写が誘導される。本制御系は Invitrogen 社より T-Rex システムとしてキット化されている。

これらは目的遺伝子を過剰発現させることを目的に開発された制御系であり、われわれはこれらの発現系を種々の改良型アデノウイルスベクターなどに搭載させた場合の遺伝子発現制御特性について報告してきた^{3)~5)}。最近われわれは上記②の制御系を siRNA 発現ベクターの場合についても応用し、テトラサイクリンにより RNAi 効果を調節できるアデノウイルスベクター発現系を開発した²⁾。

まず、H1 プロモーターの TATA Box と転写開始点の間に Tet オペレーター配列 (19 bp) を 1 コピー挿

入した H1tetO プロモーターを作製し、このプロモーターが通常の H1 プロモーターと同様に siRNA (shRNA) を発現し、RNAi 効果を誘導できること、TetR との相互作用で H1 プロモーターによる転写を制御できることを確認した。転写開始点にはクローニングサイトの BglII 部位を有しており、下流に存在する XbaI 部位などと併せて用いることで、目的の siRNA (shRNA) 配列の挿入が簡便に行えるように設計されている。このベクター pHM5-H1tetO はわれわれにより開発された *in vitro* ライゲーション法によるアデノウイルスベクター作製法^{6)~8)} (クロンテック社より Adeno-X Expression System としてキット化されている) 用のシヤトルプラスミドになっており、I-CeuI と PI-SceI 部位を利用してアデノウイルスベクタープラスミドの E1 欠損領域に簡単に siRNA 発現カセットを挿入できる。作製した組換えプラスミドをベクタープラスミド上のアデノウイルスゲノム両末端に存在する制限酵素部位 PacI で線状化し、パッケージング細胞である 293 細胞にトランスフェクションすると組換えアデノウイルスベクターができる (図 1)。

準備

① プラスミド、オリゴヌクレオチド

● プラスミド：シヤトルプラスミド (pHM5-H1tetO)、ベクタープラスミド (I-CeuI/PI-SceI 処理済みベクタープラスミド、クロンテック)

● オリゴヌクレオチド：リンカー配列とターゲット配列 (センス、アンチセンス) を含むオリゴヌクレオチド^{*1)}。実験例で示した c-myc の場合は以下の配列^{*2)}。

(5'-gatccccgatgaggaagaaatcgatgttcaagagacatcgatttcttctcatcttttgaaat-3' and

5'-ctagatttccaaaagatgaggaagaaatcgatgtctcttgaacatcgatttcttctcatcggg-3')

(下線はループ配列を示す)

② 細胞

● 293 細胞 (アデノウイルスベクター増幅のためのパッケージング細胞)

③ トランスフェクション試薬

● SuperFect (キアゲン) ^{*3)}

^{*1)} ゲル濾過精製の非リン酸化オリゴで十分である。

^{*2)} ターゲット配列の検索法は他の総説等を参照していただきたい。

^{*3)} われわれは SuperFect を主に用いているが、一般的なトランスフェクション試薬であれば使用できる。

④ 酵素

- ◎ 制限酵素 (*Bgl* II, *Xba* I, I-*Ceu* I, PI-*Sce* I, *Swa* I, *Pac* I) (NEB)
- ◎ T4 DNA ligase (NEB など)

⑤ その他

- ◎ コンピテントセル DH5 α (TOYOBO など)
- ◎ Adeno-X Expression System (クロンテック)

プロトコール

in vitro ライゲーション法によるアデノウイルスベクター作製の原理や、高タイターのウイルスを増幅させるためのコツ・プロトコールはわれわれの過去の総説を参照していただきたい⁸⁾⁹⁾。本稿では、ベクタープラスミド作製までのプロトコールを中心に解説する。

① siRNA 発現シャトルプラスミドの作製

① アニーリング

センスオリゴ [5'-gatcccc (N19) ttcaagaga (N19) tttttggaat-3']、アンチセンスオリゴ [5'-ctagatttccaaaa (N19) tctcttgaa (N19) ggg-3'] をハイブリダイゼーションする^{※1)}。

② ライゲーション

pHM5-H1tetO を *Bgl* II と *Xba* I で切断し、上記のオリゴヌクレオチドとライゲーションする。ライゲーション産物を *Bgl* II 処理し^{※2)}、大腸菌 (DH5 α など) にトランスフォーメーションし、カナマイシンプレートに播種する。

③ 制限酵素による確認、シーケンス

独立大腸菌クローンを培養し、プラスミドを回収する (ミニプレップ)。インサートが入ったプラスミドは *Xba* I で切断されるが *Bgl* II では切断されないで、これらの酵素によるプラスミドの切断をアガロースゲル電気泳動で確認する。さらに、インサートをシーケンス解析し、目的のクローンを選択する。

② ベクタープラスミドの作製

① 制限酵素処理

siRNA 発現カセットを有したシャトルプラスミド (カナマイシン耐性遺伝子を保有) を I-*Ceu* I と PI-*Sce* I で処理する。Adeno-X Expression System に付属の double digestion buffer で両酵素を同時に作用させてもよいし、1つずつ酵素処理させてもよい。処理後、フェノール・クロロホルム抽出し、エタノール沈殿、70%エタノールでの洗浄を行い、オートクレーブ水に懸濁する。なお、I-*Ceu* I の over digest はスター活性を生

※1) ハイブリダイゼーションしたオリゴヌクレオチドは *Bgl* II 部位と *Xba* I 部位に結合でき、ライゲーション産物が *Xba* I で再切断され、*Bgl* II で再切断されないように設計されている。

※2) セルフライゲーションによる親プラスミドの出現を防ぐため。

じるので、作用させるユニット数、反応時間は厳守のこと^{※3}。

② ライゲーション

I-Ceu I と PI-Sce I で処理したシャトルプラスミド 50～200 ng^{※4} と Adeno-X Viral DNA (I-Ceu I & PI-Sce I-digested : クロンテック) をライゲーションする。16℃で1時間以上反応させた後、フェノール・クロロホルム抽出し、エタノール沈殿、70%エタノールでの洗浄を行い、Swa I で処理する^{※5}。その後、大腸菌 (DH5a など) にトランスフォーメーションし、アンピシリンプレートに播種する。

③ 大腸菌の培養、制限酵素による確認

個々の独立大腸菌クローンを 1.5～2.0 ml のアンピシリン (100 μg/ml) 入り LB 培地で培養し、4～5 時間後、アンピシリン (50 mg/ml) を 3～4 μl 加え、コンフルエントになるまで (おおよそ 8 時間) 培養する。30 kb を超える巨大なプラスミドを保有した大腸菌の培養ではアンピシリン濃度が下がりやすいので、途中で一度アンピシリンを付加する。プラスミドをミニプレップすることで回収し^{※6}、Hind III や Xho I による切断パターンを指標に組換え体を選択する^{※7}。

④ 293 細胞へのトランスフェクション

組換えベクタープラスミド 1～5 μg 相当を Pac I 処理し、SuperFect を用いて 293 細胞にトランスフェクションする。その後のウイルスの増幅法は過去の総説を参照していただきたい⁹⁾。また、TetR 発現アデノウイルスベクターはシャトルプラスミド pShuttle (クロンテック) に TetR 遺伝子 (T-Rex システム : Invitrogen) を挿入することで同様に作製する。

※3 シャトルプラスミドは complete digestion する必要はない。

※4 電気泳動などによる目的の DNA フラグメントの回収は不要である。

※5 Swa I は Adeno-X Viral DNA の I-Ceu I と PI-Sce I の間に存在する制限酵素部位であり、Swa I 処理することでセルフライゲーションによる親プラスミドの出現を防ぐことができる。

※6 われわれは古典的なアルカリ SDS 法に準じた方法でミニプレップしている。

※7 通常 90% 以上のクローンは目的の組換え体である。Adeno-X Forward & Reverse PCR Primer (クロンテック) を用いて PCR により組換え体を選択してもよい。Adeno-X Viral DNA を Hind III や Xho I で切断した場合の切断パターンはわれわれの論文^{6) 7)} やクロンテック社の添付のプロトコールを参照していただきたい (Adeno-X Viral DNA は pAdHM10 と同一である)。

実験例

ヒト c-myc をターゲットにして調節型 siRNA 発現アデノウイルスベクターと TetR 発現アデノウイルスベクターを A549 細胞と HepG2 細胞に作用させ、ドキシサイクリンの有無による siRNA (および shRNA) の発現レベル (図 2)、および c-Myc タンパク質レベル (図 3) への影響を検討した²⁾。siRNA の発現はドキシサイクリン非存在下ではほとんど認められなかったが、ドキシサイクリン存在下では強く誘導されており、ドキシサイクリンにより siRNA の発現が転写レベルで制御されていることが確認された。c-Myc タンパク質の発現レベルを種々の濃度のドキシサイクリン存在下で検討したところ、濃度依存的に c-Myc タン

パク質の発現低下が認められ、 10^{-1} μg/ml のドキシサイクリンで発現低下がプラトーに達した。本結果は、ドキシサイクリンの濃度を調整することで、ターゲット遺伝子の発現レベルを制御できることを示しており、用量反応に応じた遺伝子機能解析を可能にする強力なツールになると期待された。

おわりに

目的遺伝子の抑制レベルを自由に制御することが可能なベクターとしては、①本稿で紹介したベクター系と基本原理は同一で Tet オペレーター配列を 2 コピー挿入したベクターが Invitrogen 社 (BLOCK-iT 誘導

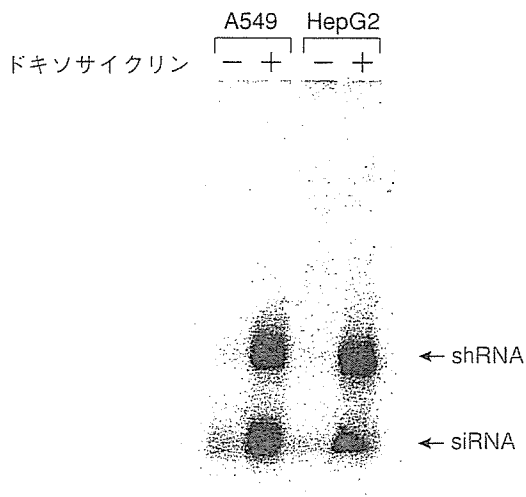


図2 siRNA (shRNA) 発現の調節

c-myc に対する調節型 siRNA 発現アデノウイルスベクターと TetR 発現アデノウイルスベクターを A549, HepG2 細胞に作用させ、ドキシサイクリン (1 μ g/ml) 存在下・非存在下で 3 日間培養した。siRNA (shRNA) の発現をノーザンブロッティングで調べた

性発現システム) から、② TetR と Kid-1 タンパク質 (SD^{Kid-1}) 分子中の KRAB-AB サイレンサードメインとの融合タンパク質の tTS (tetracycline-controlled transcriptional silencer) を利用して、KRAB-AB サイレンサードメインが Tet オペレーター配列の下流にあるプロモーターの転写活性を抑制することを利用したベクター系がクロンテック社よりキット化 (BD Knockout Inducible RNAi System) されている。それぞれの調節系の特徴を把握し、目的に応じて使い分けすることが必要であろう。

アデノウイルスベクターによる効率のよい遺伝子導入には、標的細胞上にアデノウイルス受容体 (cox-sackievirus-adenovirus receptor: CAR) の発現を必要とする。そのため、CAR の発現が乏しい細胞 (造血幹細胞をはじめとする血液系細胞, 間葉系幹細胞, 樹状細胞, 血管内皮細胞, 血管平滑筋細胞, 骨格筋細胞, 滑膜細胞, 多くのマウス由来の細胞株など) へはアデノウイルスベクターが適用できないことが問題となっている。われわれはカプシドタンパク質を改変することで、このような細胞種へも効率よく遺伝子導入できるさまざまなタイプの改良型アデノウイルスベクターを開発しており、広範な目的に本ベクターが適用

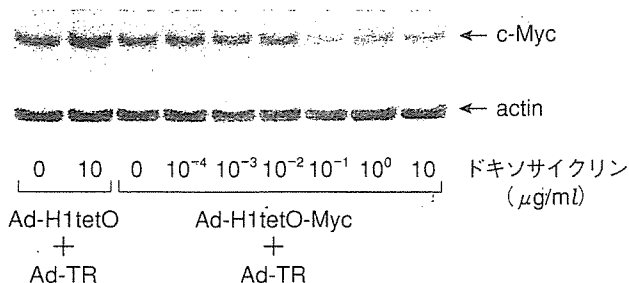


図3 c-Myc 発現抑制の調節

c-myc に対する調節型 siRNA 発現アデノウイルスベクター (Ad-H1 tetO-Myc) あるいはプロモーターカセットだけを搭載した siRNA 発現アデノウイルスベクター (Ad-H1 tetO) と、TetR 発現アデノウイルスベクター (Ad-TR) を HepG2 細胞に作用させ、種々の濃度のドキシサイクリン存在下で 3 日間培養した。c-Myc の発現をウエスタンブロッティングで調べた

可能となっている (改良型アデノウイルスベクターについては過去の総説を参照していただきたい^{1) 10) 11)}。目的遺伝子の抑制レベルを自由に制御することが可能なアデノウイルスベクターが生命科学の進展に貢献することを期待している。

本研究は、医薬品医療機器総合機構・早川堯夫博士, 国立医薬品食品衛生研究所・山口照英博士・細野哲司博士, 神戸学院大学・真弓忠範博士, 大阪大学大学院薬学研究科・中川晋作博士, 理化学研究所バイオリソースセンター・形山和史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。

文献

- 1) 水口裕之, 早川堯夫: 蛋白質核酸酵素, 48: 1653-1662, 2003
- 2) Hosono, T. et al.: Hum. Gene Ther., 15: 813-819, 2004
- 3) Mizuguchi, H. & Hayakawa, T.: J. Gene Med., 4: 240-247, 2002
- 4) Xu, Z. L. et al.: Gene, 309: 145-151, 2003
- 5) Mizuguchi, H. et al.: Hum. Gene Ther., 14: 1265-1277, 2003
- 6) Mizuguchi, H. & Kay, M. A.: Hum. Gene Ther., 9: 2577-2583, 1998
- 7) Mizuguchi, H. & Kay, M. A.: Hum. Gene Ther., 10: 2013-2017, 1999
- 8) 水口裕之, 早川堯夫: 細胞工学, 18: 1824-1827, 1999
- 9) 水口裕之, 早川堯夫: 実験医学, 20: 1799-1804, 2002
- 10) 水口裕之, 早川堯夫: BIO INDUSTRY, 22: 16-21, 2005
- 11) Mizuguchi, H. & Hayakawa, T.: Hum. Gene Ther., 15: 1022-1033, 2004

カプシドタンパク質を改変し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

Efficient Gene Transfer by Capsid-Modified Improved Adenovirus Vectors

水口裕之^{*1} 早川堯夫^{*2}

アデノウイルスベクターは既存の遺伝子治療用ベクターの中では最も遺伝子導入効率に優れているが、アデノウイルス受容体 (CAR) を発現している細胞にしか遺伝子導入できないこと、ベクターの感染域に組織特異性がないことが課題となっている。筆者らは、これらの問題点を克服し、CAR 非依存的に高効率に遺伝子導入できるベクターや、ターゲティング能を有した改良型アデノウイルスベクターの開発を進めている。

1. はじめに

アデノウイルスベクターは遺伝子導入効率に優れていることから、がんをはじめとする疾患に対する遺伝子治療臨床研究や、遺伝子機能解析などを目的とした基礎研究に汎用されている。しかしながら、従来のアデノウイルスベクター (2型あるいは5型アデノウイルスを基盤としている) による遺伝子導入には、標的細胞にアデノウイルス受容体 (CAR: coxsackievirus-adenovirus receptor) の発現を必要とするため、CAR の発現が乏しい細胞 (造血幹細胞をはじめとする血液系細胞、間葉系幹細胞、樹状細胞、血管内皮細胞、血管平滑筋細胞、骨格筋細胞、滑膜細胞、多くのマウス由来の細胞株など) へはアデノウイルスベクターが適用できないことが問題となっている。また、がん細胞は悪性度の進行と共に、CAR の発現レベルが低下することが報告されており^{1, 2)}、アデノウイルスベクターを用いてがんを対象とした遺伝

子治療臨床研究を進める上で考慮すべき問題となっている。

筆者らのグループでは、このような問題を克服できるベクターとして、CAR を利用しなくても効率良く遺伝子導入できる改良型アデノウイルスベクターの開発を進めている。本稿では、感染域を改変したアデノウイルスベクターの開発とその応用例を紹介すると共に、カプシドタンパク質を改変することで、組織特異性を有したターゲティングアデノウイルスベクターの開発状況について簡単に紹介する。なお、アデノウイルスベクターに関する基本的な解説は、筆者らの過去の総説^{3, 4)}などを参考にしていきたい。

2. カプシドタンパク質を改変した改良型アデノウイルスベクターの開発

アデノウイルスベクターによる遺伝子導入時の CAR 依存性を克服するために、ファイバータンパク質を改変した改良型ベクターの開発が進んで

^{*1}Hiroyuki Mizuguchi 独医薬基盤研究所

^{*2}Takao Hayakawa 国立医薬品食品衛生研究所 副所長

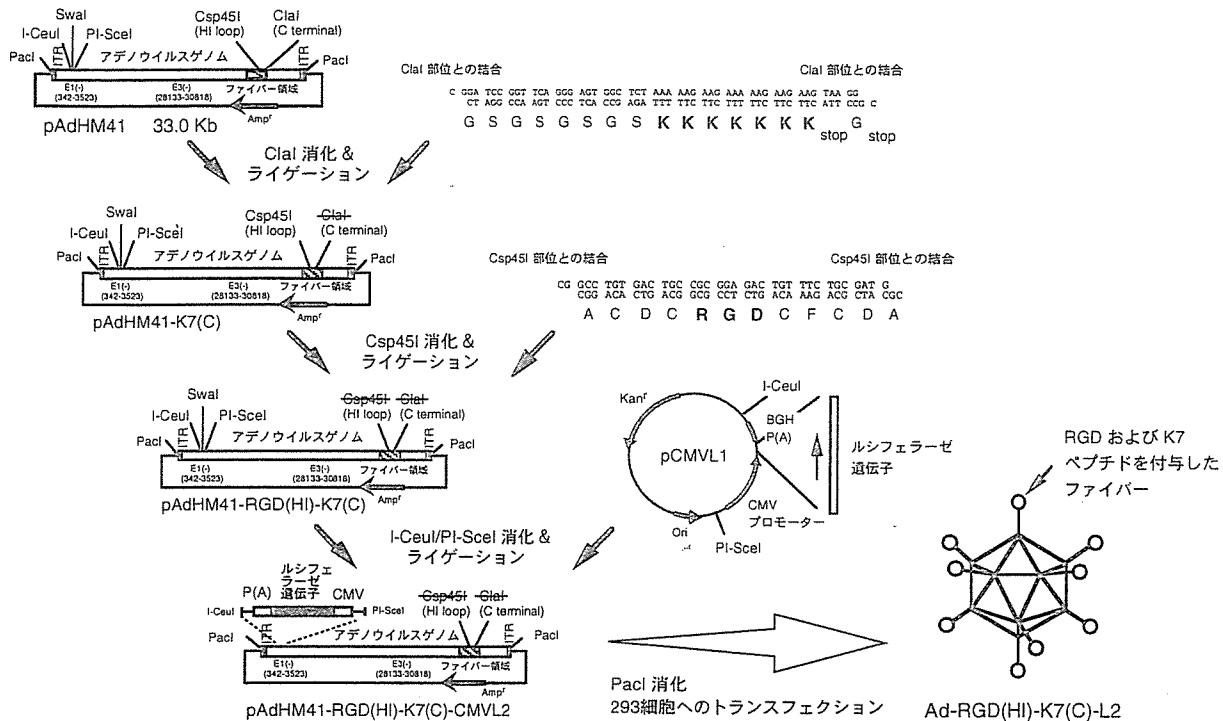


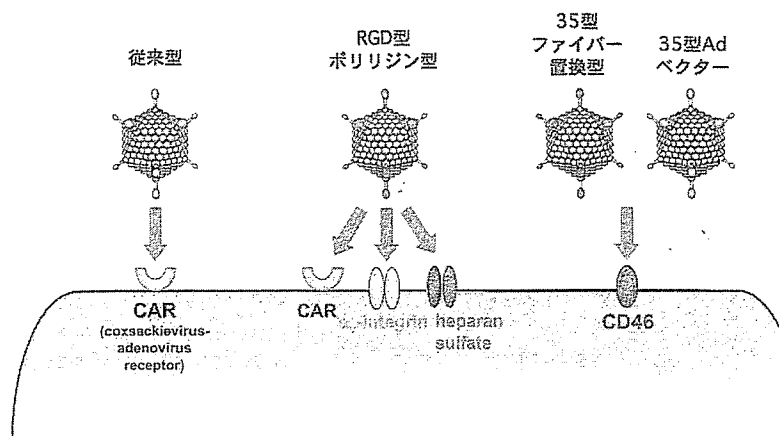
図1 ファイバー改変アデノウイルスベクターの作製法

ファイバーノブのHIループあるいはC末端をコードする遺伝子配列部分にユニークな制限酵素であるCsp45IあるいはClaI部位（それぞれ）をもったベクタープラスミドpAdHM41を両酵素で切断し、挿入したいペプチド（この場合 RGD 配列およびポリリジン配列）に相当する合成オリゴ DNA を *in vitro* ライゲーションで導入する。その後、I-CeuI と PI-SceI 部位を利用して *in vitro* ライゲーションでルシフェラーゼ遺伝子を E1 欠損部位に挿入する。生じたプラスミドをウイルスゲノム両末端に存在する PacI 部位で切断し、293 細胞にトランスフェクションすると、RGD 配列とポリリジン配列をファイバーに有するルシフェラーゼ発現アデノウイルスベクターができる。

いる。ファイバーはテール、シャフト、ノブの3領域からなり、ノブ領域が CAR と結合する。筆者らは、ファイバーノブの外來ペプチドの挿入部位として適した HI ループや C 末端コード領域に、1ステップの *in vitro* ライゲーションで任意の外來ペプチドコード遺伝子を挿入できるシステムを開発しており、極めて簡便に様々なペプチドをファイバーに表現した改良型アデノウイルスベクターが作製できるようになった^{5, 6)} (図1)。本ファイバー改変アデノウイルスベクター作製法を用いて、 α_v インテグリンに親和性がある RGD (Arg-Gly-Asp) ペプチドや、ヘパラン硫酸に親和性があるポリリジンペプチドをファイバー表面上に遺伝子工学的に表現させることにより、CAR を発現していない細胞に対しても効率良く遺伝子導入できるベクターの作製も可能となった^{5, 6)} (図2)。これらのベクターは、多くの細胞で発現

している α_v インテグリンやヘパラン硫酸を認識して感染できることから、様々な細胞種や広範な目的への適用が期待できる。

ファイバー改変アデノウイルスベクターとしては、ファイバー領域だけを CAR 以外の分子を受容体としている 5 型アデノウイルスとは異なった血清型のアデノウイルス (3・11・35 型など sub-group B に属するアデノウイルス) 由来のファイバーに置換したベクターも開発されている。筆者らは、ファイバー部分を 35 型アデノウイルス由来のファイバーに置き換えたアデノウイルスベクター、および全ての構造タンパク質を 35 型アデノウイルス由来したベクターを開発しているが⁷⁻⁹⁾、これらのベクターは赤血球を除くほぼ全てのヒト由来細胞で発現が認められる CD46 を認識して感染できるため、ヒト由来細胞をターゲットとする場合には極めて有効である。しかし、齧



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配列やポリリジン配列をファイバーに有したファイバー改変ベクターは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、35型のアデノウイルスのファイバーを有したベクターや、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は、CD46を認識して感染する。

図2 ファイバー改変アデノウイルスベクター

歯類由来の細胞はCD46を発現しておらず、ほとんど遺伝子導入できないこと、本ベクターの *in vivo* での機能を評価する小動物（マウス、ラットなど）のモデルがなく（齧歯類由来の細胞へは遺伝子導入できないため）、遺伝子治療への応用を目的とした場合には課題点となっている。後者の問題を克服するために、筆者らはヒトCD46発現トランスジェニックマウスをモデル系として用いることで、35型アデノウイルスベクター（あるいは35型アデノウイルス由来のファイバーを有したベクター）の機能を検討中である。

感染域を変更する他のアプローチとして、ファイバーノブ部分をファイバータンパク質と同様に3量体を形成するレオウイルスの表面タンパク質である $\sigma 1$ に置き換え、 $\sigma 1$ が認識する junctional adhesion molecule 1 (JAM1) を認識して遺伝子導入できるようなアデノウイルスベクターも開発されている¹⁰⁾。

3. 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（応用例）

カプシドタンパク質を改変し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の応用例として、遺伝子治療や再生医療（細胞治療）で重要な細胞への適用について以下に簡単に紹介する。改良型アデノウイルスベクターを用いることで、従来は遺伝子導入が困難であった多くの細胞種に対して効率の良い遺伝子導入が可能となっており、基礎研究や治療を目的とした応用研究に極めて重

要な基盤技術になっている。

3.1 間葉系幹細胞

間葉系幹細胞は再生医療のための細胞ソースとして注目されており、細胞分化関連遺伝子を導入して目的細胞を分化誘導したり、治療用タンパク質を産生させるように細胞機能を改変した間葉系幹細胞を治療へ応用する場合には、高効率の遺伝子導入系が不可欠である。しかしながら、ヒト間葉系幹細胞は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10数倍、35型ファイバーを付与したベクターでは200~300倍、ポリリジンペプチドを付与したベクターでは約1,000倍の遺伝子発現効率を示した。ヒト間葉系幹細胞への遺伝子導入にはポリリジン型の改変アデノウイルスベクターが最適であり、100%の細胞で目的遺伝子を発現させることが可能である（写真1）。

3.2 CD34陽性細胞

ヒト造血幹細胞を含む画分であるCD34陽性細胞では、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。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⁸⁾。RGD型やポリリジン型の改変アデノウイルスベクターは、CD34陽性細胞への遺伝子導入には適していない。

3.3 樹状細胞

樹状細胞は生体防御を担う最も強力な抗原提示細胞であり、遺伝子改変を加えて樹状細胞機能を高めた細胞療法は、がんなどへの難治性疾患に対する新しい治療法として期待されている。しかしながら、従来の遺伝子導入法では樹状細胞への遺伝子導入も困難であることが知られている。アデノウイルスベクターを用いた場合も、ヒトおよびマウス樹状細胞（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）への遺伝子導入効率は10%以下と低いが、RGD型の改変アデノウイルスベクターでは、ほぼ100%の遺伝子導入効率を示す^{11, 12)}。ヒト樹状細胞へは、35型ファイバー

を有したベクターも有効である。

3.4 その他

脂肪細胞分化研究に汎用されている細胞株である3T3-L1マウス脂肪前駆細胞や脂肪細胞への遺伝子導入には、ポリリジン型の改変アデノウイルスベクターが極めて有効である¹³⁾（写真2）。ヒト間葉系幹細胞から分化誘導した脂肪細胞に対しては35型ファイバーを有したベクターが有効である。

また、メラノーマに対しては一般にRGD型のベクターが適している^{6, 14)}。

4. ターゲティングアデノウイルスベクターの開発

標的細胞指向性を有したベクターの開発は、遺伝子治療の有効性と安全性の向上のために重要な

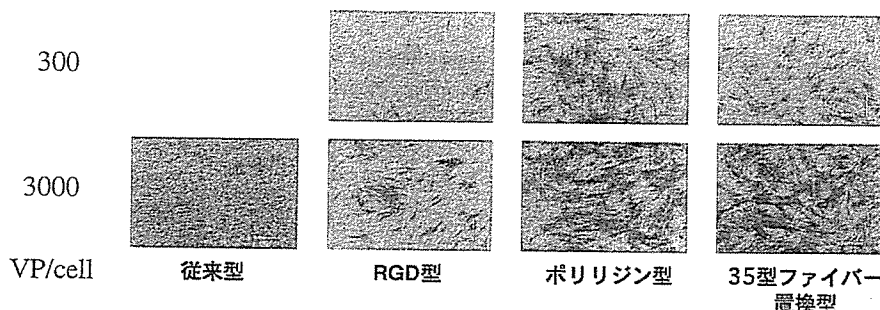


写真1 間葉系幹細胞に対する各種ファイバー改変アデノウイルスベクターの遺伝子発現効率

ヒト初代培養間葉系幹細胞に対して、 β ガラクトシターゼ (LacZ) を発現する各種ファイバー改変アデノウイルスベクター（従来型、RGD型、ポリリジン型、35型ファイバー置換型）を300または1,000 VP (vector particle)/cellの条件下で作用させ、2日後 X-gal 染色を行った。

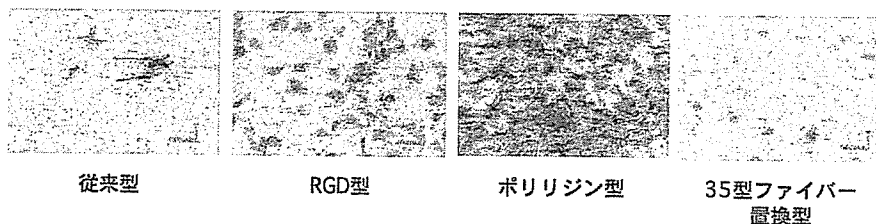


写真2 3T3-L1 脂肪前駆細胞に対する各種ファイバー改変アデノウイルスベクターの遺伝子発現効率

マウス3T3-L1細胞に対して、LacZを発現する各種ファイバー改変アデノウイルスベクター（従来型、RGD型、ポリリジン型、35型ファイバー置換型）を10,000 VP/cellの条件下で作用させ、2日後 X-gal 染色を行った。

研究課題である。遺伝子工学的にカプシドタンパク質を改変してターゲティング能を有したアデノウイルスベクターを作製するには、CAR を介した感染経路を遮断することが第一に必要である。また、低親和性であるがファイバーの根本に存在するペントンベースの RGD モチーフが αv インテグリンと結合することによって起こる感染ルートや、ファイバーのシャフト領域がヘパラン硫酸に結合することによって起こる感染ルートも遮断する必要がある。このような経路での感染を回避した改変アデノウイルスベクターのファイバー領域などに、ターゲット細胞特異的に結合するリガンドを付与すればターゲティングアデノウイルスベクターの開発が可能になる (図 3)。

ファイバーノブの AB ループや FG ループに変異を導入すれば CAR と結合できないアデノウイルスベクターが作製でき¹⁵⁾、ペントンベースの RGD モチーフを欠損させれば、 αv インテグリンと結合できないベクターが作製できる¹⁶⁾。また、ファイバーのシャフト部分の KKTK からなるヘパリン結合ドメインを改変すればヘパラン硫酸と結合できないベクターができる¹⁷⁾。筆者らは、

KKTK 配列を欠く 35 型アデノウイルスのファイバーのシャフトに、CAR との結合能を欠損させた 5 型アデノウイルスのファイバーノブ、さらにペントンベースの RGD モチーフを欠損させたトリプル変異を有したアデノウイルスベクターが、従来のアデノウイルスベクターに比べマウス肝臓への移行活性 (アデノウイルスベクターは全身投与すると 95% 以上のベクターは肝臓に移行し遺伝子発現させる) が 3 万分の 1 以下に減少することを見出しており、積極的に特定の臓器に移行しないベクターの開発に成功している¹⁸⁾ (なお、1 つの領域だけに変異を加えたベクターでは肝移行性は減少させることができず¹⁶⁾、2 つの領域に変異を加えたベクターでは肝移行性は数百倍減少する¹⁸⁾)。本ベクターのファイバーノブの HI ループや C 末端コード領域には、任意の外来ペプチドコード遺伝子が容易に挿入できるように、制限酵素ユニーク部位が付与されており、リガンドを自在にベクター表面に表現できるようになっている。本システムが、ターゲティング能をもったアデノウイルスベクター開発のための基盤になると期待される。現在はいかにして親和性の高いター

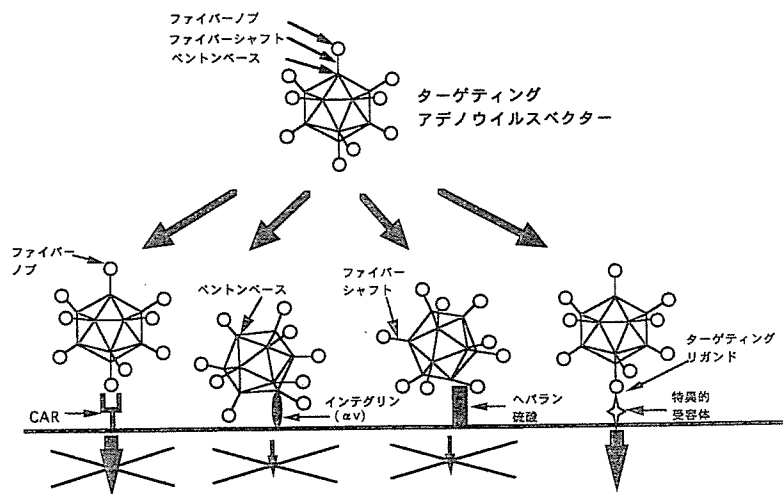


図3 ターゲティング能を有したアデノウイルスベクターの構造

ターゲティング能を有したアデノウイルスベクターの開発のためには、①ファイバーと CAR との結合を介した感染ルートを回避し、②低親和性であるがペントンベースの RGD モチーフが αv インテグリンと直接結合することによって起こる感染ルートを回避し、③ファイバーシャフト領域がヘパラン硫酸に作用することによって起こる感染ルートも回避し、④細胞特異的な受容体を介してのみ感染するベクターを開発する必要がある。