

Gene Ontology Tree: Biological Process

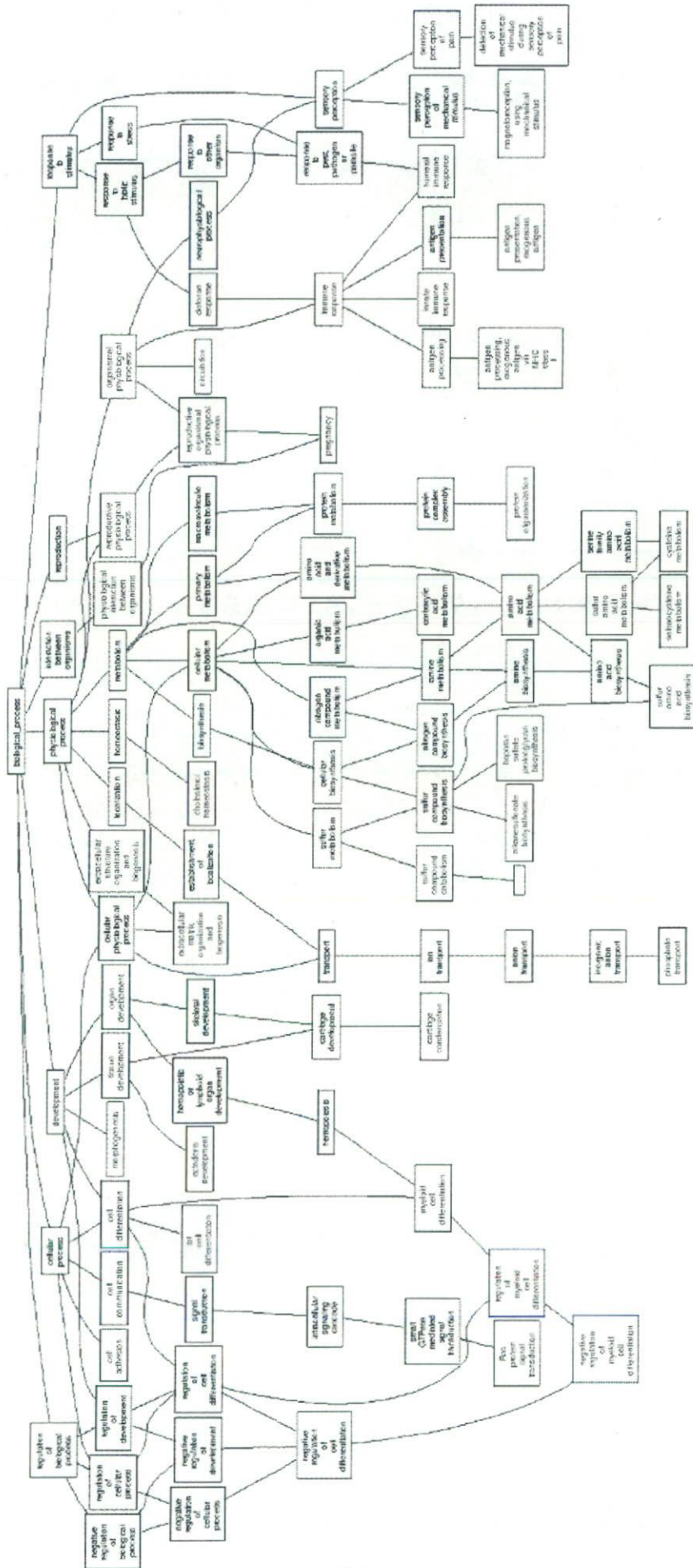


Fig. 4a 複数ロットのヒト骨髄由来間葉系幹細胞の間のばらつき (CV値) の大きい遺伝子に関するオントロジー解析 (Biological Process) 6ロット (継代数7または9) のCV値の高いtop 1000 Probe Setsを抽出、継代数9の細胞についてもtop 1000を抽出し、継代数7と9のtop 1000に共通して含まれる428 Probe Setsを抽出した。GOTM* (Vanderbilt Univ.)を用い、上記Probe Setの集団に有意(P<0.01)に濃縮される生理機能を探索した。赤: 有意(P<0.01)に濃縮されるオントロジークラスター

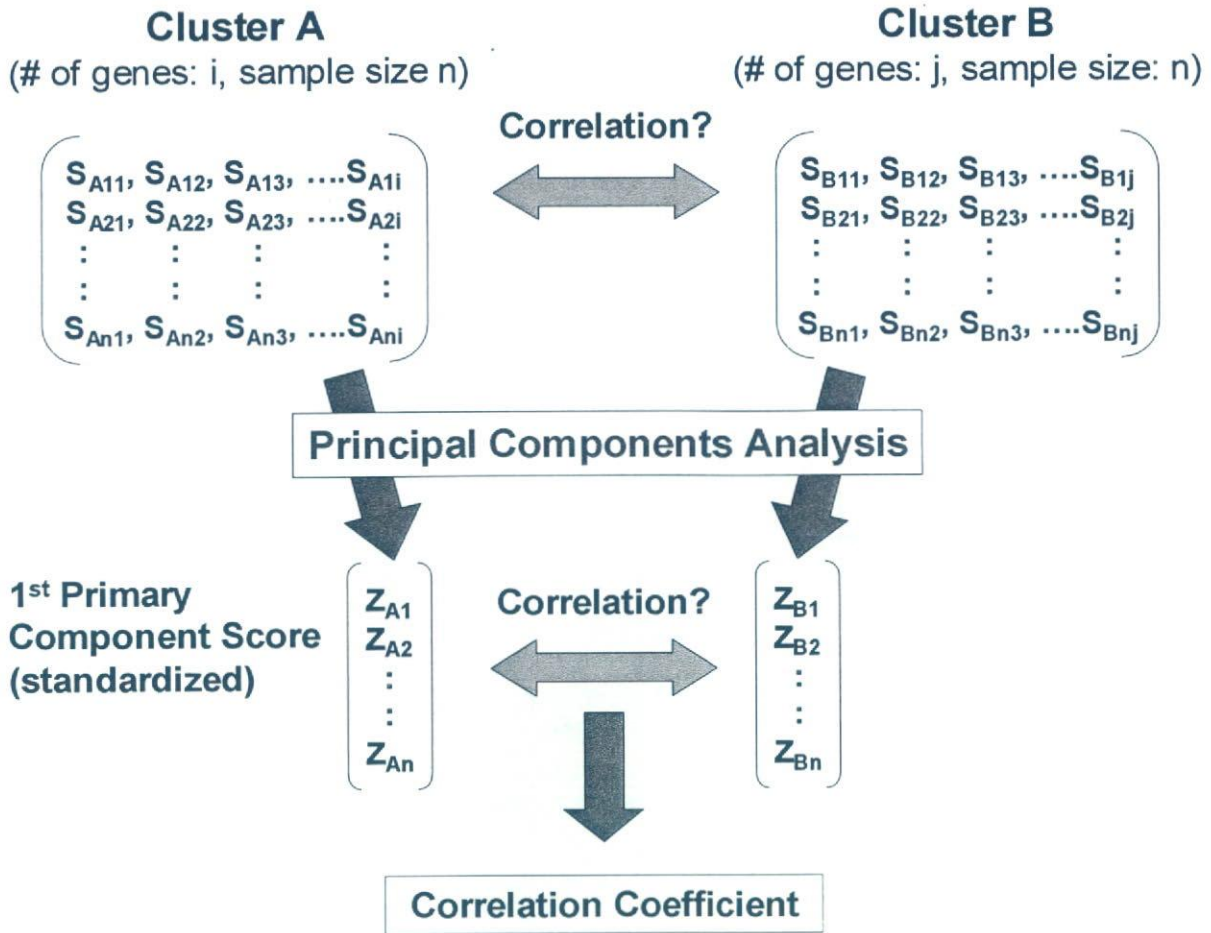


Fig. 5 遺伝子オントロジークラスター間の相関関係の検討
 相関係数として、スピアマンの順位相関係数を採用し、 $P < 0.001$ を
 もって有意な相関係数と判定した。

別紙 4

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の 編集者名	書 籍 名	出版社名	出版地	出版年	ページ
堤康夫、石井 明子、早川堯 夫	機能性人工タンパ ク質	早川堯夫	バイオ医薬品の 開発と品質・安全 性確保	エル・アイ・ シー	東京	2007	369-78
石井明子、鈴 木琢雄、川西 徹、山口照 英、早川堯夫	植物を用いた医薬 品の現状と品質・安 全性の確保	早川堯夫	バイオ医薬品の 開発と品質・安全 性確保	エル・アイ・ シー	東京	2007	702-18
水口裕之、櫻 井文教、川端 健二	カプシドタンパク 質改変アデノウイ ルスベクター	田畑泰彦	遺伝子医学 MOOK 別冊 絵 で見てわかるナ ノ DDS	メディカルド ゥ	大阪	2007	235-42
川崎ナナ、伊 藤さつき、山 口照英	抗体医薬品の LC/MS	植田充美	抗体医薬品の最 前線	シーエムシー 出版	東京	2007	105-15
山口照英、石 井明子	次世代バイオ医薬 品の開発にあっ ての非臨床・臨床試 験についてー TGN1412 事故が医 薬品開発に与えた インパクト.	安全性評価 研究会（谷 本学校）編 集企画委員 会	谷本学校毒性質 問箱 第 10 号	サイエンティ スト社	東京	2007	1-34
Kawasaki N, Itoh S, Yamaguchi T.	LC/MS of oligosaccharides.	Naoyuki Taniguchi	Glycoscience Lab Manual	Springer	東京	印刷中	

Itoh S, Takakura D, Kawasaki N, Yamaguchi T.	Glycosylation analysis using LC/MS and LC/MSn. Site-specific glycosylation analysis if a glycoprotein.	John Walker	The protein Protocols Hand-book. Third Edition.	Humana Press	USA	印刷中
川崎ナナ, 橋 井則貴, 山口 照英	文部科学省特定領 域研究「糖鎖による タンパク質と分子 複合体の機能解析」 (Functional GLycomics)研究成 果公開発表シンポ ジウム	古川鋼一	第3の生命鎖:糖 鎖の謎が今, 解る			印刷中

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Ng MK, Wu J, Chang E, Wang BY, Katzenberg-Clark R, Ishii-Watabe A, Cooke JP.	A central role for nicotinic cholinergic regulation of growth factor-induced endothelial cell migration.	<i>Arterioscler Thromb Vasc Biol.</i>	27(1)	106-12	2007
山口照英	ヒト細胞治療薬の品質と安全性確保について	<i>Bio Clinica</i>	27	67-74	2007
Ishii-Watabe A, Kanayasu-Toyoda T, Suzuki T, Kobayashi T, Yamaguchi T, Kawanishi T.	Influences of the recombinant artificial cell adhesive proteins on the behavior of human umbilical vein endothelial cells in serum-free culture.	<i>Biologicals.</i>	35(4)	247-57	2007
Yamaguchi T, Uchida E.	Regulatory aspects of oncolytic virus products.	<i>Curr Cancer Drug Targets.</i>	7(2)	203-8	2007
Sakurai F, Kawabata K, Mizuguchi H.	Adenovirus vectors composed of subgroup B adenoviruses.	<i>Curr Gene Ther.</i>	7(4)	229-38	2007
川端健二・櫻井文教・水口裕之	改良型アデノウイルスベクターを用いた遺伝子デリバリー	<i>Drug Delivery System</i>	22(2)	148-54	2007
山口照英、内田恵理子	日米EU医薬品規制調和国際会議遺伝子治療専門家会議の活動と遺伝子治療薬の規制における国際動向	<i>Drug Delivery System</i>	22-6	651-9	2007
Sakurai F, Akitomo K, Kawabata K, Hayakawa T, Mizuguchi H.	Downregulation of human CD46 by adenovirus serotype 35 vectors.	<i>Gene Ther.</i>	14(11)	912-9	2007
Murakami S, Sakurai F, Kawabata K, Okada N, Fujita T, Yamamoto A, Hayakawa T, Mizuguchi H.	Interaction of penton base Arg-Gly-Asp motifs with integrins is crucial for adenovirus serotype 35 vector transduction in human hematopoietic cells.	<i>Gene Ther.</i>	14(21)	1525-33	2007

Watanabe T, Tobe K, Nakachi Y, Kondoh Y, Nakajima M, Hamada S, Namiki C, Suzuki T, Maeda S, Tadakuma A, Sakurai M, Arai Y, Hyogo A, Hoshino M, Tashiro T, Ito H, Inazumi H, Sakaki Y, Tashiro H, Furihata C.	Differential Gene Expression Induced by Two Genotoxic N-nitroso Carcinogens, Phenobarbital and Ethanol in Mouse Liver Examined with Oligonucleotide Microarray and Quantitative Real-time PCR.	<i>Genes and Environment</i>	29	115-27	2007
Mizuguchi H, Funakoshi N, Hosono T, Sakurai F, Kawabata K, Yamaguchi T, Hayakawa T.	Rapid construction of small interfering RNA-expressing adenoviral vectors on the basis of direct cloning of short hairpin RNA-coding DNAs.	<i>Hum Gene Ther.</i>	18(1)	74-80	2007
Kanayasu-Toyoda T, Ishii-Watabe A, Suzuki T, Oshizawa T, Yamaguchi T.	A new role of thrombopoietin enhancing ex vivo expansion of endothelial precursor cells derived from AC133-positive cells.	<i>J Biol Chem.</i>	282(46)	33507-14	2007
Nishida M, Onohara N, Sato Y, Suda R, Ogushi M, Tanabe S, Inoue R, Mori Y, Kurose H.	Galpha12/13-mediated up-regulation of TRPC6 negatively regulates endothelin-1-induced cardiac myofibroblast formation and collagen synthesis through nuclear factor of activated T cells activation.	<i>J Biol Chem.</i>	282(32)	23117-28	2007
Kanayasu-Toyoda T, Suzuki T, Oshizawa T, Uchida E, Hayakawa T, Yamaguchi T.	Granulocyte colony-stimulating factor promotes the translocation of protein kinase Ciota in neutrophilic differentiation cells.	<i>J Cell Physiol.</i>	211(1)	189-96	2007

Hashii N, Kawasaki N, Nakajima Y, Toyoda M, Katagiri Y, Itoh S, Harazono A, Umezawa A, Yamaguchi T.	Study on the quality control of cell therapy products. Determination of N-glycolylneuraminic acid incorporated into human cells by nano-flow liquid chromatography/Fourier transformation ion cyclotron mass spectrometry.	<i>J Chromatogr A.</i>	1160(1-2)	263-9	2007
Koizumi N, Yamaguchi T, Kawabata K, Sakurai F, Sasaki T, Watanabe Y, Hayakawa T, Mizuguchi H.	Fiber-modified adenovirus vectors decrease liver toxicity through reduced IL-6 production.	<i>J Immunol.</i>	178(3)	1767-73	2007
Niimi S, Harashima M, Hyuga M, Yamguchi T.	Study of hepatocytes using RNA interference.	<i>J Organ Dysfunction.</i>	3	164-82	2007
Kawai H, Suzuki T, Kobayashi T, Ishii-Watabe A, Sakurai H, Ohata H, Honda K, Momose K, Hayakawa T, Kawanishi T.	Caspase cascade proceeds rapidly after cytochrome c release from mitochondria in tumor necrosis factor-alpha-induced cell death.	<i>J Pharmacol Sci.</i>	103(2)	159-67	2007
Uchida E, Kogi M, Oshizawa T, Furuta B, Satoh K, Iwata A, Murata M, Hikata M, Yamaguchi T.	Optimization of the virus concentration method using polyethyleneimine-conjugated magnetic beads and its application to the detection of human hepatitis A, B and C viruses.	<i>J Virol Methods.</i>	143(1)	95-103	2007

Sanda T, Okamoto T, Uchida Y, Nakagawa H, Iida S, Kayukawa S, Suzuki T, Oshizawa T, Suzuki T, Miyata N, Ueda R.	Proteome analyses of the growth inhibitory effects of NCH-51, a novel histone deacetylase inhibitor, on lymphoid malignant cells.	<i>Leukemia.</i>	21(11)	2344-53	2007
Luan Y, Suzuki T, Palanisamy R, Takashima Y, Sakamoto H, Sakuraba M, Koizumi T, Saito M, Matsufuji H, Yamagata K, Yamaguchi T, Hayashi M, Honma M.	Potassium bromate treatment predominantly causes large deletions, but not GC>TA transversion in human cells.	<i>Mutat Res.</i>	619(1-2)	113-23	2007
Shinozaki Y, Sato Y, Koizumi S, Ohno Y, Nagao T, Inoue K.	Retinoic acids acting through retinoid receptors protect hippocampal neurons from oxygen-glucose deprivation-mediated cell death by inhibition of c-jun-N-terminal kinase and p38 mitogen-activated protein kinase.	<i>Neuroscience.</i>	147(1)	153-63	2007
川崎ナナ, 橋井則貴, 伊藤さつき, 山口照英	細胞治療薬の品質・安全性評価における糖鎖解析の重要性と LC/MS の応用可能性	<i>News Letter 糖鎖フラッシュ号, Functional Glycomics</i>	9	35-41	2007
川崎ナナ, 内田恵理子, 宮田直樹	薬の名前 ステムを知れば薬がわかる 第7回	<i>Pharm Tech Japan</i>	23(2)	81-87	2007
川崎ナナ, 内田恵理子, 宮田直樹	薬の名前 ステムを知れば薬がわかる 第9回	<i>Pharm Tech Japan</i>	23(4)	101-9	2007
川崎ナナ, 内田恵理子, 宮田直樹	薬の名前 ステムを知れば薬がわかる 第12回	<i>Pharm Tech Japan</i>	23(8)	85-93	2007
内田恵理子, 川崎ナナ, 宮田直樹	薬の名前 ステムを知れば薬がわかる 第15回	<i>Pharm Tech Japan</i>	23(11)	93-100	2007

内田 恵理子	遺伝子治療薬開発の現状と品質・安全性確保における国際的動向	<i>Pharmstage</i>	7(9)	1-5	2007
Yokoyama U, Sato Y, Akaike T, Ishida S, Sawada J, Nagao T, Quan H, Jin M, Iwamoto M, Yokota S, Ishikawa Y, Minamisawa S.	Maternal vitamin A alters gene profiles and structural maturation of the rat ductus arteriosus.	<i>Physiol Genomics.</i>	31(1)	139-57	2007
山口照英、土屋利江	細胞組織利用医薬品・医療機器の安全性とその有用性評価	<i>YAKUGAKU ZASSHI.</i>	127(5).	839-40	2007
水口裕之	アデノウイルスベクター開発の最前線	バイオテクノロジージャーナル	7(2)	168-73	2007
山口照英	Gene Therapy Discussion Group の動向について	<i>医薬品研究</i>	38	50-59	2007
川崎ナナ, 伊藤さつき, 原園 景, 橋井 則貴, 山口照英	液体クロマトグラフィー/質量分析法を用いた糖タンパク質構造解析	<i>実験医学増刊号</i>	25	1127-36	2007
内田恵理子、石井(渡部) 明子、山口照英	遺伝子治療薬及び細胞治療薬のウイルス安全性確保.	<i>臨床とウイルス</i>	35	278-90	2007
Mukai N, Akahori T, Komaki M, Li Q, Kanayasu-Toyoda T, Ishii-Watabe A, Kobayashi A, Yamaguchi T, Abe M, Amagasa T, Morita I.	A comparison of the tube forming potentials of early and late endothelial progenitor cells.	<i>Exp Cell Res.</i>	314(3)	430-40	2008
川崎ナナ、内田恵理子、宮田直樹	薬の名前 ステムを知れば薬がわかる 第18回	<i>Pharm Tech Japan</i>	24(1)	101-5	2008
Kizuka Y, Kobayashi K, Kakuda S, Nakajima Y, Kawasaki N, Oka S.	Laminin-1 is a novel carrier glycoprotein of non-sulfated HNK-1 epitope in mouse kidney	<i>Glycobiology</i>			印刷中

Haghighi K, Chen G, Sato Y, Fan GC, He S, Kolokathis F, Pater L, Paraskevaidis I, Jones WK, Dorn Ii GW, Th Kremastinos D, Kranias EG.	A human phospholamban promoter polymorphism in dilated cardiomyopathy alters transcriptional regulation by glucocorticoids.	<i>Hum Mutat.</i>			印刷中
川崎ナナ, 石井明子, 山口照英	糖鎖と生物薬品	<i>J Applied Glycoscience.</i>			印刷中
Kawasaki N, Itoh S, Yamaguchi T.	LC/MSn for glycoproteome analysis: Glycosylation analysis and peptide sequencing of glycopeptides.	<i>Methods in Molecular Biology,</i>			印刷中
川崎ナナ, 内田恵理子, 宮田直樹	薬の名前. ステムを知れば薬がわかる 第21回	<i>Pharm Tech Japan</i>			印刷中
山口照英, 石井明子	細胞・組織加工医薬品の品質と安全性確保への提言	<i>PHARMSTAGE</i>			印刷中
Kawasaki N, Itoh S, Hashii N, Harazono A, Takakura D, Yamaguchi T.	Mass spectrometry for analysis of carbohydrate heterogeneity in characterization and evaluation of glycoprotein products.	<i>Trends in Glycosci. Glycotech.</i>			印刷中
川崎ナナ, 橋井則貴, 山口照英	糖鎖異常の網羅的解析	蛋白質核酸酵素増刊号「糖鎖情報の独自性と普遍性」			印刷中

カプシドタンパク質改変アデノウイルスベクター

水口裕之・櫻井文教・川端健二

要旨

ベクター学 (vectorology) と遺伝子工学の進歩により、ナノサイズのウイルス表面を自由に改変し、感染域の制御 (drug delivery system: DDS) が可能なウイルスベクターが開発されている。本稿では、カプシドタンパク質を遺伝子工学的に改変することで、有効性・安全性に優れた改良型アデノウイルスベクターの開発研究について解説する。

キーワード

アデノウイルス、遺伝子、遺伝子治療、ターゲティング、DDS、造血幹細胞、再生医療、免疫、CAR

はじめに

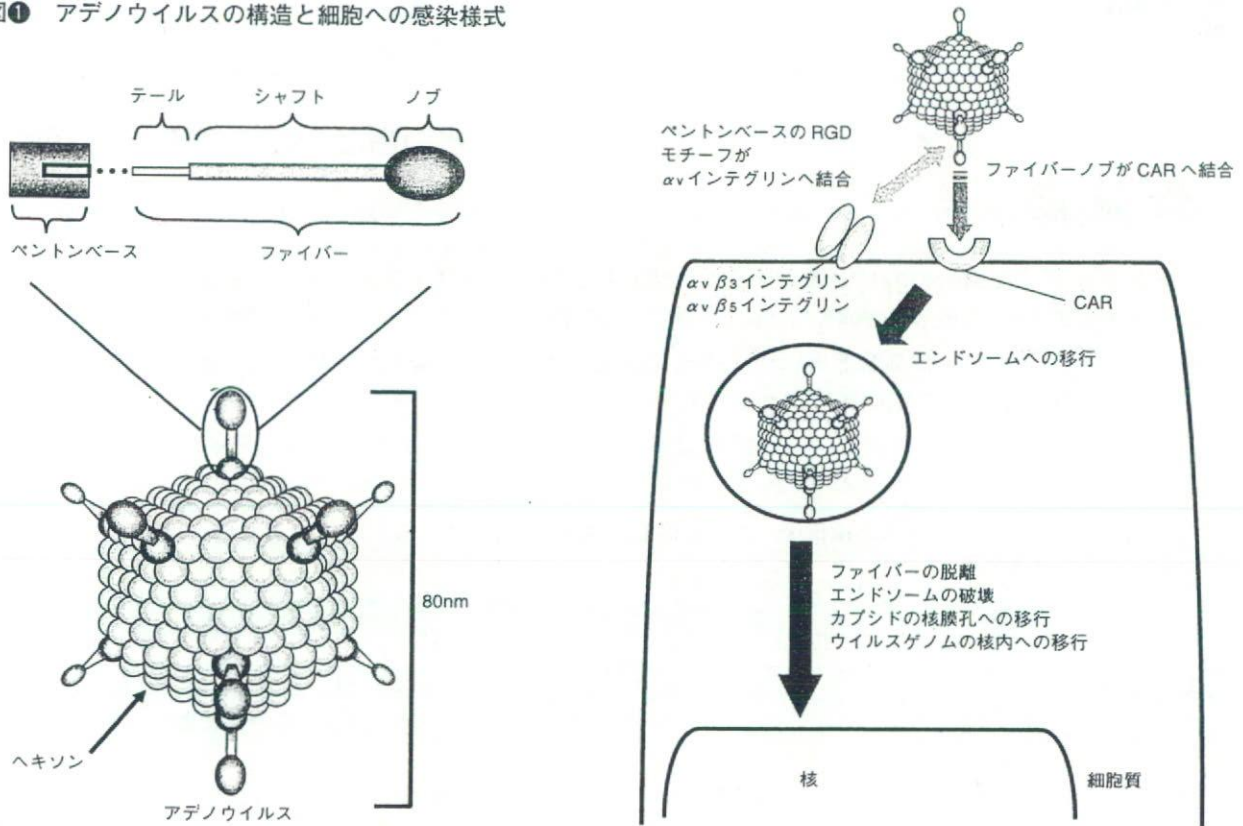
ウイルスベクターの開発研究は、遺伝子治療の進展とともに発展しており、これまでの遺伝子治療臨床研究で用いられてきた第一世代のウイルスベクター (ウイルス表面タンパク質の改変などを伴わないベクター) の限界を克服できる第二世代のウイルスベクターの開発研究が、ウイルス (ベクター) 学や遺伝子工学、ナノサイエンス (多くのウイルスは直径数十～数百 nm のサイズである) の発展とともに活発に行われている。本稿では、直径約 80nm のアデノウイルスの表面タンパク質を遺伝子工学的に改変することで感染域を制御できる改良型アデノウイルスベクターの開発研究について解説する。

I. アデノウイルスベクターの特徴

ヒトアデノウイルスは、これまでに 51 種類の血清型¹⁾が発見されており、遺伝子の構造解析が最も進んでいる 2 型と 5 型 (sub-group C に属する) アデノウイルスが遺伝子治療臨床研究で一般に用いられている (最近では、後述するように他の血清型のアデノウイルスもベクター化されている)。ウイルスは大別すると脂質二重膜に覆われたエンベロープウイルス (インフルエンザや HIV、

ヘルペスウイルスなど) と、タンパク質の殻で覆われた非エンベロープウイルスに分けられるが、アデノウイルスは 252 個のタンパク質の殻 [カプソメア: 240 個のヘキソンと 12 個のペントン (ペントンベースとファイバー²⁾からなる) から構成される] で覆われた正 20 面体構造をした非エンベロープウイルスである (図①)。ウイルスの細胞内への侵入は、ファイバーがアデノウイルス受容体 (coxsackievirus-adenovirus receptor: CAR, 2 型や 5 型アデノウイルスにおける受容体) に結合し¹⁾、その後ペントンベースの RGD (Arg-Gly-Asp) モチーフが細胞表面上のインテグリン ($\alpha_v\beta_3$, $\alpha_v\beta_5$) に結合することによって起こる (図①)。エンドソームに達したウイルスは酸性条件下でカプシドタンパク質の構造変化を起こし、エンドソームを破壊して細胞質内に侵入する。その後、ウイルスゲノムは効率よく核内に運ばれ、自身の遺伝子の転写が起こる。アデノウイルスゲノムは約 36Kb の線状二本鎖 DNA からなっており、その遺伝子は初期遺伝子の E1・E2・E3・E4 と、後期遺伝子の L1・L2・L3・L4・L5 に大別される (図②)。初期遺伝子は主にウイルス DNA の複製に、後期遺伝子は主にカプシドなどの構造タンパク質の合成に参与する。アデノウイルスベクターは、他のウイルスタンパク質の合成を誘導する E1 領域 (E1 領域は E1a と E1b に分けられ、E1a により

図1 アデノウイルスの構造と細胞への感染様式



アデノウイルスは252個のカプソメアよりなる正20面体構造をしている。そのうち頂点にある12個は突起構造をもったベントン（ベントンベースとファイバーからなる）と呼ばれ、他の240個はヘキソンと呼ばれる。ウイルスの細胞内への侵入は、ファイバーがアデノウイルス受容体（CAR）に結合し、その後ベントンベースのRGDモチーフが細胞表面上のインテグリン（ $\alpha_v\beta_3$ 、 $\alpha_v\beta_5$ など）に結合することで内化される。エンドソームに達したウイルスは酸性条件下でカプシドタンパク質の構造変化を起こし、エンドソームを破壊して細胞質内に侵入する。その後、カプシドが核膜孔に結合し、ウイルスゲノムを核内に放出する。

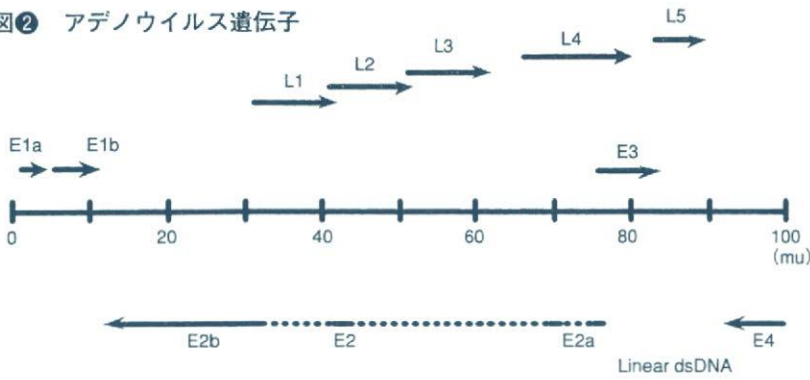
すべてのアデノウイルスのプロモーターが活性化される）を削除し、この領域を外来遺伝子に置き換えることにより増殖不能ウイルスとしている（E1欠損領域以外の領域に外来遺伝子を挿入する場合もある）。アデノウイルスベクターを増幅する場合には、E1タンパク質をトランスに供給できる細胞株である293細胞⁴⁾などを使用する。

アデノウイルスベクターは、①既存のベクターでは最も遺伝子導入効率が良いこと〔非ウイルスベクター（カチオン性リボソーム・DNA複合体）と比較すると、*in vivo*での活性は臓器にもよるが1～5オーダー以上効率が良い²⁾〕、②導入遺伝子が宿主染色体への組み込み活性をもたず、染色体外にエピソームとして存在することから、一過性の遺伝子発現を示すこと（細胞増殖に伴い導入遺

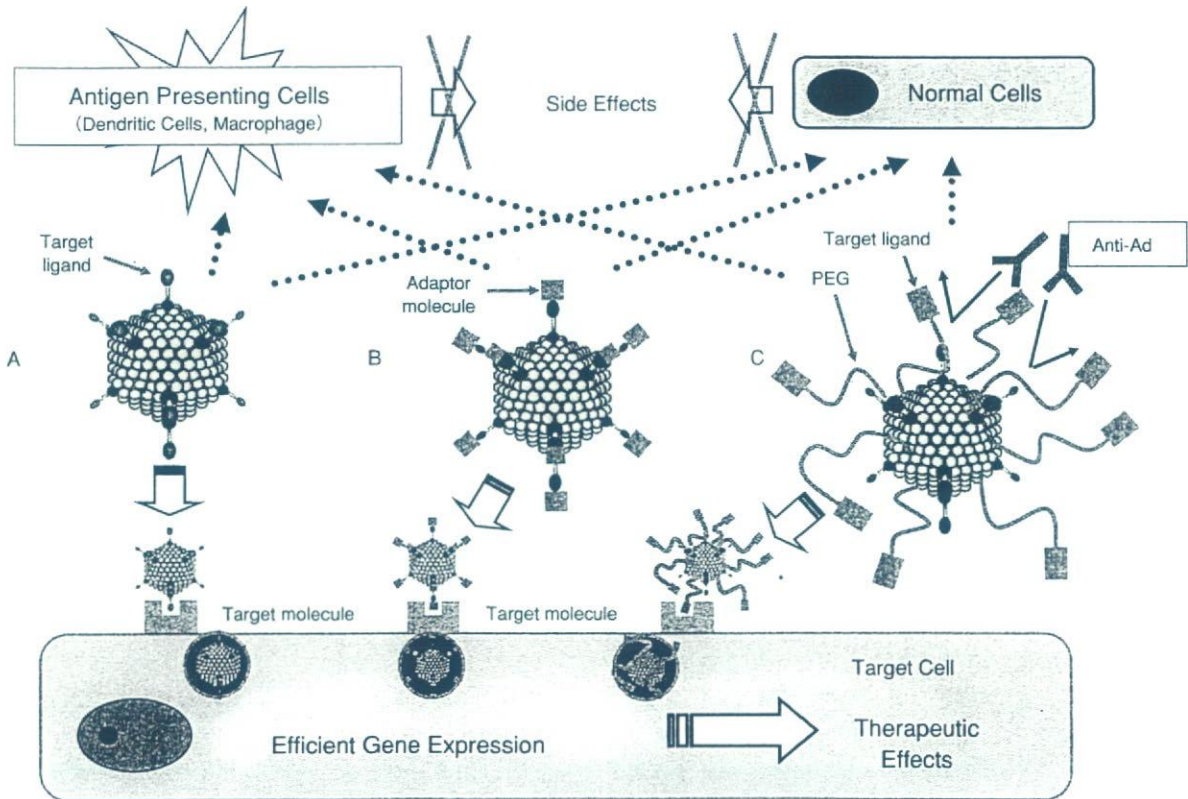
伝子が希釈されることで、一過性の遺伝子発現を示す。一方、分化した増殖停止期の細胞に対しては、アデノウイルスに対する免疫の問題が克服されれば、数ヶ月以上の長期の遺伝子発現を示す³⁾）、③他のウイルスベクターに比べ圧倒的に高いタイター（力価）のベクター（通常、他のベクターに比べ1000倍以上）が得られること、などの長所を有し、ベクターとしての優れた基本的性質を有している。

一方、①遺伝子導入がCARの発現レベルに依存し、CARを発現していない細胞への適用が困難であること、②組織特異性を示さないこと、③免疫反応を伴うこと、などの問題点を有し、これらの問題を克服し、機能面で優れた次世代アデノウイルスベクターの開発が欧米を中心に盛んに行われている。

図② アデノウイルス遺伝子



図③ 標的細胞指向性を制御できるアデノウイルスベクター



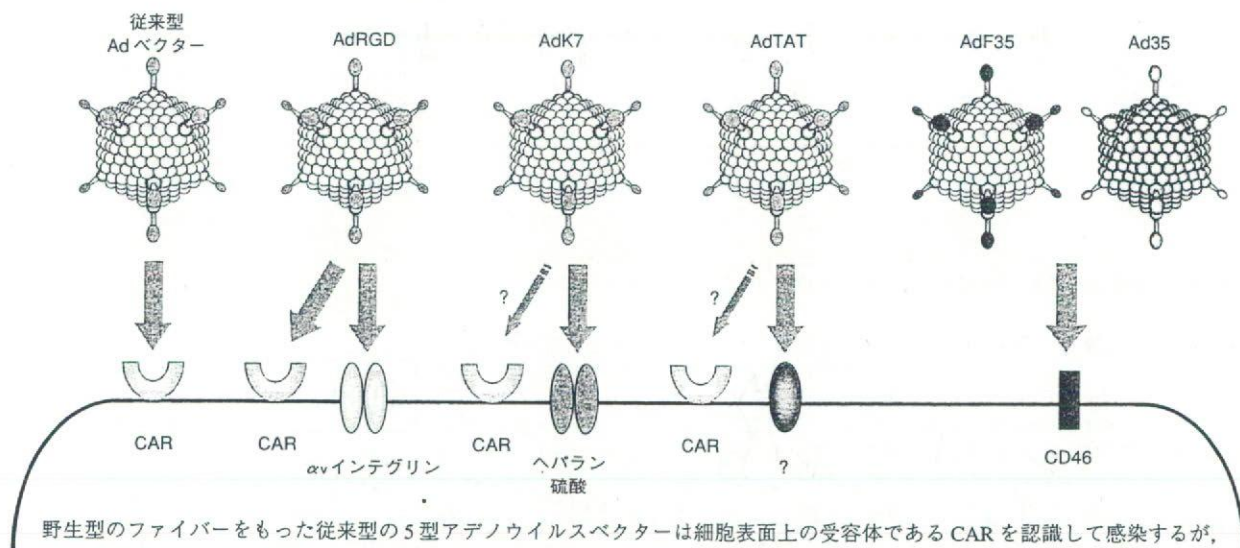
標的細胞指向性を制御でき、組織特異性を有するアデノウイルスベクター開発のための方法論としては主に3つのアプローチに別けられる。
 A. ウィルスカプシドの遺伝子工学的改変 B. アダプター分子の使用による生化学的改変
 C. リガンドを付与した高分子による化学的改変

II. 標的細胞指向性の制御が可能なアデノウイルスベクターの開発と応用

アデノウイルスベクターの感染域を制御する（標的細胞指向性を制御する）アプローチとしては、①カプシド

タンパク質の遺伝子工学的な改変、②アダプター分子の使用による生化学的な改変、③高分子でベクター表面を修飾することによる化学的な改変、などがある（図③）。ここでは①のアプローチについて、著者らの研究を中心に紹介する。②③のアプローチについては、著者らの過

図4 各種改良型アデノウイルスベクター



野生型のファイバーをもった従来型の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アデノウイルスベクター (AdRGD, AdK7) はCARだけでなく、 α_v インテグリンやヘパラン硫酸を認識しても感染できる。TATペプチドを付与したAdTATは、詳細な細胞内移行メカニズムは不明であるが、CAR非依存的に感染できる。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 (AdF35) や、すべ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。

(グラビア頁参照)

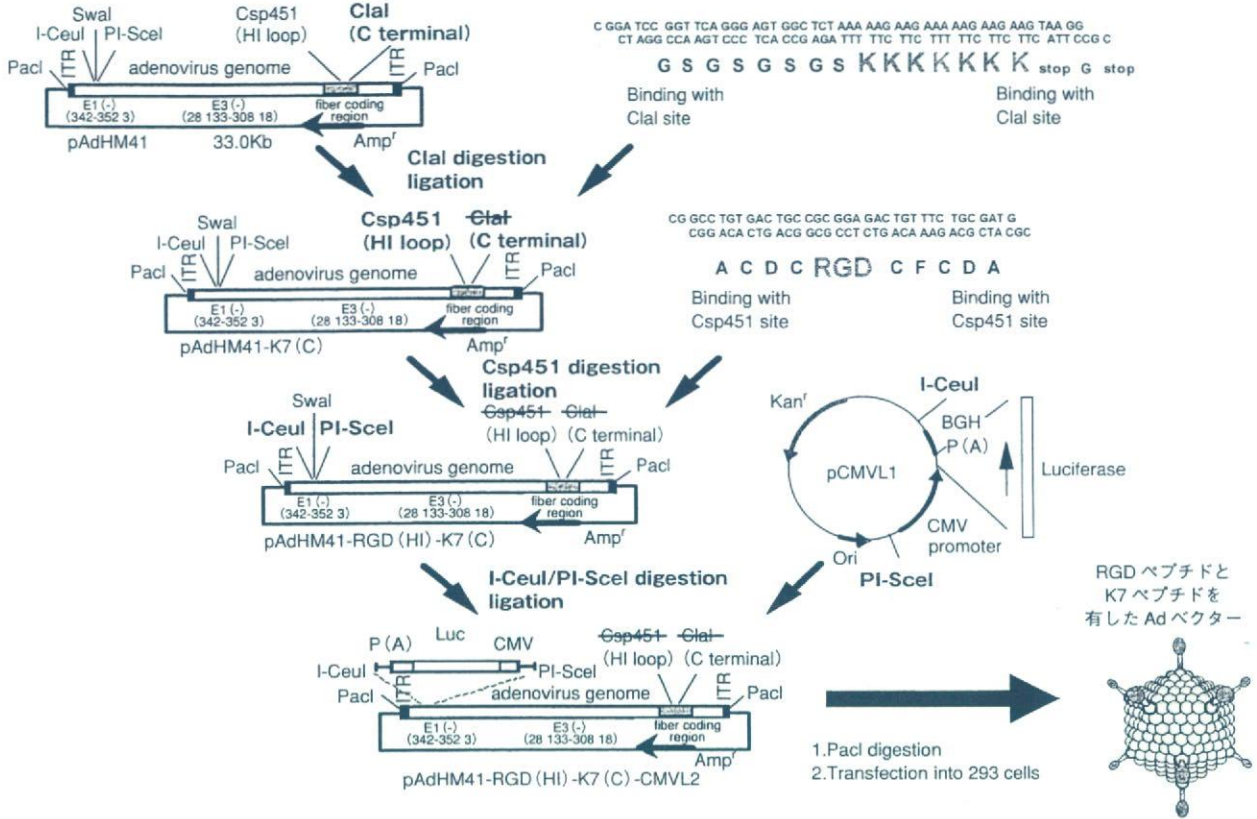
去の総説⁴⁾や共同研究者の倉知らの解説⁵⁾を参照されたい。

従来型のヒト5型アデノウイルスベクターは、細胞表面のCARを認識して細胞に感染する(図1, 4)。しかしながら、遺伝子治療の適用細胞の一部である造血幹細胞をはじめとする血液系細胞、樹状細胞、間葉系幹細胞、血管平滑筋細胞などはCARを発現しておらず、アデノウイルスベクターでの効率の良い遺伝子発現が期待できない。そこで、CARとの結合を担うウイルス表面タンパク質のファイバーを改変することで、CAR以外の分子を認識して感染できるようなベクターの開発が進められている。例えば、 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、受容体は不明であるがHIV (human immunodeficiency virus) 由来のprotein transduction domain (PTD, タンパク質導入ドメイン) として知られているTatペプチドをファイバー領域に付与することで、CAR陰性細胞を含む様々な細胞への効率の良い遺伝子導入が可能になる⁶⁾⁻⁹⁾(図4)。このようなベクターの開発は、ファイバー領域をコードした遺伝子配列部分を改変させることで可能になり(図5)に著者らが開発したファイバー改変アデノウイルスベクター作製法について示した。

遺伝子工学的技術を利用することでウイルスのナノレベルの改良が可能になる)、生化学的・化学的方法によるベクター改変の場合と異なり、均一なベクターが得られ、バッチごとの性能の差も少ないなどの長所を有する。また、ファイバー領域をCARではなくCD46^{用M4}を認識する11型や35型アデノウイルス由来のものに置換したり、すべての構造タンパク質を11型や35型アデノウイルス由来のベクターを用いることでも感染域の変更が可能になる¹⁰⁾⁻¹³⁾。また受容体は不明であるが、3型アデノウイルス由来のファイバーを有したベクター(3型アデノウイルスの受容体としてはCD46, CD80, CD86などが報告されているが、いまだコンセンサスは得られていない)¹⁴⁾や、ファイバーノブ部分をファイバータンパク質と同様に三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¹⁵⁾。

このようなベクターを用いることで、従来の遺伝子導入ベクターでは効率の良い遺伝子導入が困難であった造血幹細胞、樹状細胞、間葉系幹細胞、ES細胞など、様々な細胞への適用が可能になっており⁶⁾⁻¹³⁾¹⁶⁾⁻¹⁸⁾、癌や感染症に対する遺伝子治療やワクチン療法に向けた応用研究

図5 ファイバー改変アデノウイルスベクター作製法



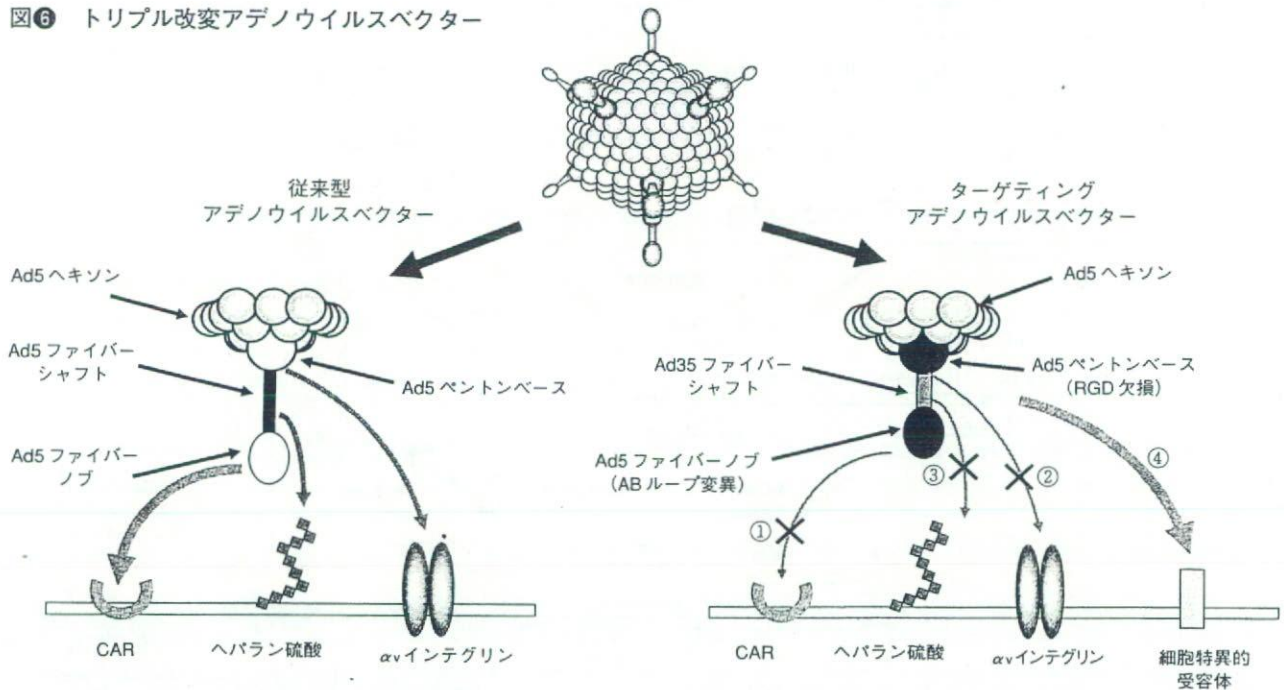
ファイバーノブのHI ループあるいはC末端をコードする遺伝子配列部分にユニークな制限酵素であるCsp451あるいはClalの切断部位(それぞれ)をもったベクタープラスミドpAdHM41を両酵素で切断し、挿入したいペプチド(この場合RGD配列およびポリリジン配列)に相当する合成オリゴDNAを*in vitro*ライゲーションで導入する。その後、I-CeuIとPI-SceI部位を利用して*in vitro*ライゲーションでルシフェラーゼ遺伝子をE1欠損部位に挿入する。生じたプラスミドをウイルスゲノム両末端に存在するPacI部位で切断し、293細胞にトランスフェクションすると、RGD配列とポリリジン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。

だけでなく、造血幹細胞遺伝子治療や樹状細胞を用いた遺伝子改変細胞治療、間葉系幹細胞やES細胞を用いた再生医療(遺伝子改変細胞治療を含む)など広範な応用研究が行われている。また、アデノウイルスベクターは癌に対する遺伝子治療臨床研究で広く用いられているが、癌細胞は悪性度の進行とともに、CARの発現低下、およびアデノウイルスベクターでの遺伝子導入効率が低下することが報告されている¹⁹⁾。カプシドタンパク質を改変したアデノウイルスベクターは、このような問題を克服することが可能になり、今後の臨床応用が期待される。なお、造血幹細胞、樹状細胞、間葉系幹細胞、ES細胞などへの遺伝子導入は、最近積極的に開発されている改良型の非ウイルスベクターを用いても依然として困難で

あり、改良型ウイルスベクターの使用は不可欠である(逆にいうと、非ウイルスベクターの場合、通常の株化細胞を用いた検討ではなく、実際の治療への応用を想定して初代培養造血幹細胞、樹状細胞、間葉系幹細胞への適用も可能なベクターの開発が期待される)。

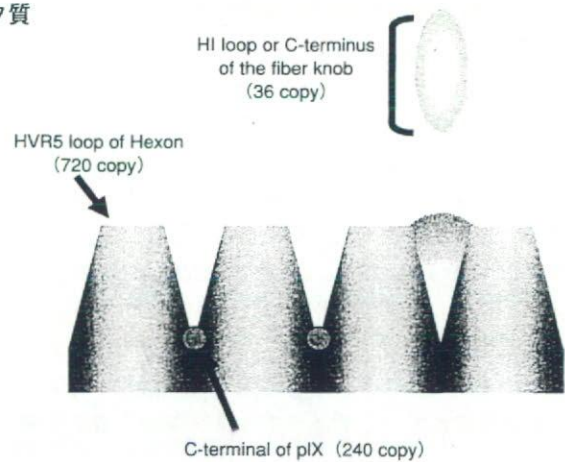
一方、*in vivo*において標的細胞特異的に遺伝子導入可能なターゲティングアデノウイルスベクターの開発も進んでいる。この場合、ネイティブのアデノウイルスが持つ感染能を消失させて、細胞特異的受容体を認識して感染できるような改変を行う必要がある。アデノウイルスは前述のようにファイバーとCARとの結合が感染に重要な役割を果たすが、低親和性であるがペントンベースのRGDモチーフやファイバーシャフトのKKTKモチーフ

図6 トリプル改変アデノウイルスベクター



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ファイバーノブと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 α v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。

図7 外来ペプチドの提示部位としての候補カプシドタンパク質



外来ペプチドを提示できるカプシドタンパク質としては、ファイバーの他に、主要カプシドタンパク質のヘキソンや、ヘキソンとヘキサソンの間に存在する protein IX (pIX) などがある。ヘキソンや pIX は、ファイバーに比べコピー数が多いという特徴を有する。なお、ファイバーとヘキソンはウイルス粒子あたり、それぞれ12, 240分子存在するが、三量体を形成しているため、外来ペプチドの提示コピー数としては36, 720コピーになる。

フが α vインテグリンやヘパラン硫酸と結合することによって起こる感染ルートが知られている³⁾。また最近では、factor XやビタミンKの血液成分がアデノウイルスと細胞との結合を橋渡しして、受容体非依存的に感染するルートも報告されている²⁰⁾²¹⁾。著者らは、ファイバーノブ、

シャフト、ペントンベースの3領域を同時に改変したトリプル改変アデノウイルスベクターを開発し、このベクターが肝臓をはじめとする *in vivo* での遺伝子導入活性をほとんど消失していることを明らかにしている²²⁾²³⁾(図6)。今後は、いかにしてアデノウイルス表面に提示しても機

能しうる細胞特異的リガンド（例えば、従来のファージ表面提示法で同定された細胞特異的ペプチドをアデノウイルス表面に付与させても、多くの場合は機能しない）を同定するかという点が最重要検討課題となっている。外来リガンドを提示できるアデノウイルスカプシド上のタンパク質としては、ファイバーの他に、主要タンパク質のヘキソンや protein IX (pIX) 領域が候補となる^{3)24)~26)}(図7)。

おわりに

ベクター学 (vectorology) と遺伝子工学の進歩により、

ナノサイズのウイルス表面タンパク質を自在に改変する技術が整ってきた。このような技術を駆使することで、ウイルスベクターの DDS も可能になり、遺伝子治療における有効性・安全性の向上が期待される。また、汎用性を高めたウイルスベクターは、遺伝子の機能解析を目的とした基礎研究のツールとしても極めて有効であり、生命科学研究一般に広く利用可能な技術になる。残念ながら日本においては、欧米に比べウイルスベクターの開発研究を積極的に行っている研究機関は少ないのが実情であるが、遺伝子治療の根幹をなす最も重要な技術であり、一人でも多くの若い研究者が本分野に参入し、研究を推進してくれることを願うばかりである。

用語解説

1. 血清型と受容体

ヒトアデノウイルスは A から F の sub-group に大別される。sub-group C に属するアデノウイルスをはじめ多くのアデノウイルスは CAR を認識して感染する（例外も存在する）。一方、sub-group B に属するアデノウイルス（11・35 型など）の受容体は永らく不明であったが、2003 年 CD46 が受容体であることが報告された。

2. ファイバー

アデノウイルスのカプシドタンパク質で、ウイルス表面から突き出た突起構造をしている。ウイルスあたり 12 分子（各々が三量体を作っている）存在する。テール、シャフト、ノブ領域からなり、ノブ領域が細胞表面上の CAR と結合するステップが感染の第一段階になる。

3. 293 細胞

ヒト胎児由来腎細胞をアデノウイルスでトランスフォームして作製された細胞株であり、E1 遺伝子を含むアデノウイルス DNA の一部を有している。

4. CD46

補体制御因子として知られており、ヒトを含む霊長類由来細胞ではほとんどの細胞に発現が認められる。一方、齧歯類由来細胞には CD46 は発現していないため、CD46 を受容体とするベクターの正確な遺伝子導入特性の評価には、ヒト CD46 トランスジェニックマウスの使用が必要になる。

参考文献

- 1) Bergelson JM, Cunningham JA, et al : Science 275, 1320-1323, 1997.
- 2) Sakurai H, Sakurai F, et al : J Control Release 117, 430-437, 2007.
- 3) Palmer DJ, Ng P : Hum Gene Ther 16, 1-16, 2005.
- 4) Mizuguchi H, Hayakawa T : Hum Gene Ther 15, 1022-1033, 2004.
- 5) 倉知慎之輔, 中川晋作 : 遺伝子医学 MOOK 5, 95-101, 2006.
- 6) Mizuguchi H, Koizumi N, et al : Gene Ther 8, 730-735, 2001.
- 7) Koizumi N, Mizuguchi H, et al : J Gene Med 5, 267-276, 2003.
- 8) Koizumi N, Yamaguchi T, et al : J Immunol 178, 1767-1773, 2007.
- 9) Kurachi S, Tashiro K, et al : Gene Ther 14, 1160-1165, 2007.
- 10) Sakurai F, Mizuguchi H, et al : Gene Ther 10, 1041-1048, 2003.
- 11) Sakurai F, Mizuguchi H, et al : Mol Ther 8, 813-821, 2003.
- 12) Sakurai F, Mizuguchi H, et al : Gene Ther 12, 1424-1433, 2005.
- 13) Stone D, Ni S, et al : J Virol 79, 5090-5104, 2005.
- 14) Kanerva A, Mikheeva GV, et al : Clin Cancer Res 8, 275-280, 2002.
- 15) Mercier GT, Campbell JA, et al : Proc Natl Acad Sci USA 101, 6188-6193, 2004.
- 16) Okada N, Saito T, et al : Cancer Res 61, 7913-7919, 2001.
- 17) Mizuguchi H, Sasaki T, et al : Biochem Biophys Res Commun 332, 1101-1106, 2005.
- 18) Kawabata K, Sakurai F, et al : Mol Ther 12, 547-554, 2005.
- 19) Okegawa T, Pong RC, et al : Cancer Res 61, 6592-6600, 2001.
- 20) Shayakhmetov DM, Gagger A, et al : J Virol 79, 7478-7491,