

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	<i>バイオテクノロジージャーナル</i>	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.	臨床とウイルス	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

200706019B (2/2)

厚生労働科学研究費補助金
ヒトゲノム・再生医療等研究事業

細胞組織利用医薬品の品質・安全性等の 評価に関する基盤技術開発研究

平成 17 ~ 19 年度 総合研究報告書

2 / 2

主任研究者 山 口 照 英

平成 20 (2008) 年 4 月

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

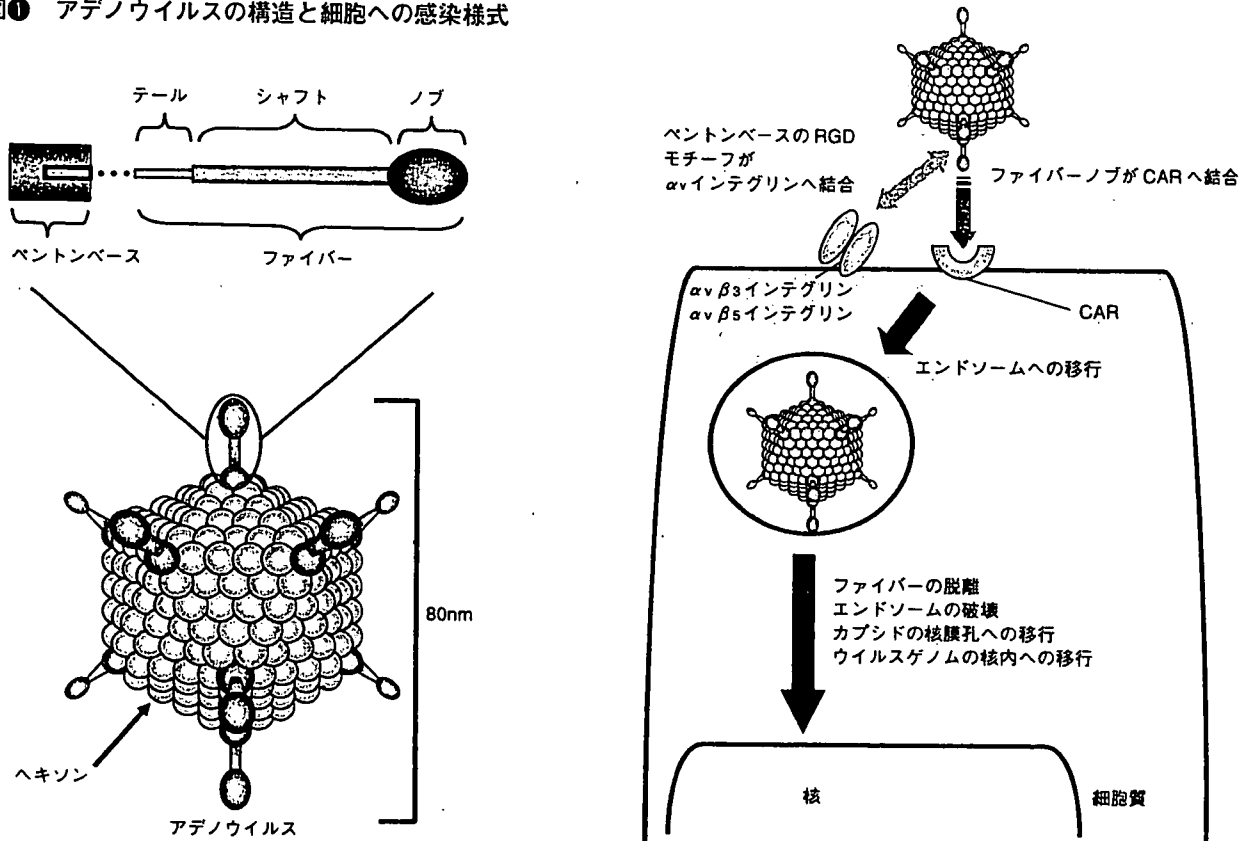
ウイルスベクターの開発研究は、遺伝子治療の進展とともに発展しており、これまでの遺伝子治療臨床研究で用いられてきた第一世代のウイルスベクター (ウイルス表面タンパク質の改変などを伴わないベクター) の限界を克服できる第二世代のウイルスベクターの開発研究が、ウイルス (ベクター) 学や遺伝子工学、ナノサイエンス (多くのウイルスは直径数十~数百 nm のサイズである) の発展とともに活発に行われている。本稿では、直径約 80nm のアデノウイルスの表面タンパク質を遺伝子工学的に改変することで感染域を制御できる改良型アデノウイルスベクターの開発研究について解説する。

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関与する。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在化される。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。

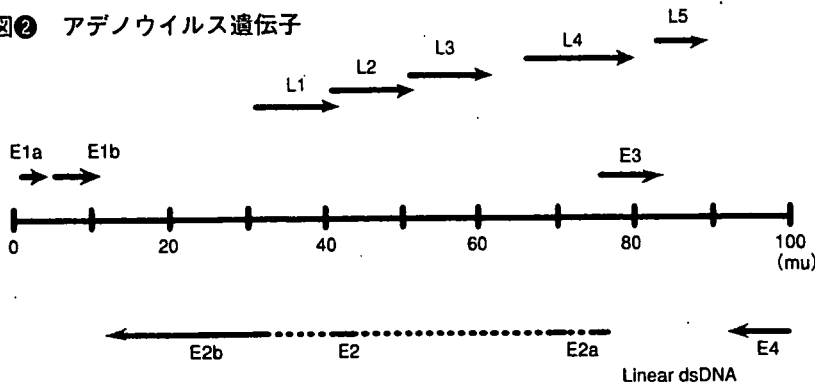
すべてのアデノウイルスのプロモーターが活性化される）を削除し、この領域を外来遺伝子に置き換えることにより増殖不能ウイルスとしている（E1欠損領域以外の領域に外来遺伝子を挿入する場合もある）。アデノウイルスベクターを増幅する場合には、E1タンパク質をトランスに供給できる細胞株である293細胞⁴⁾などを使用する。

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

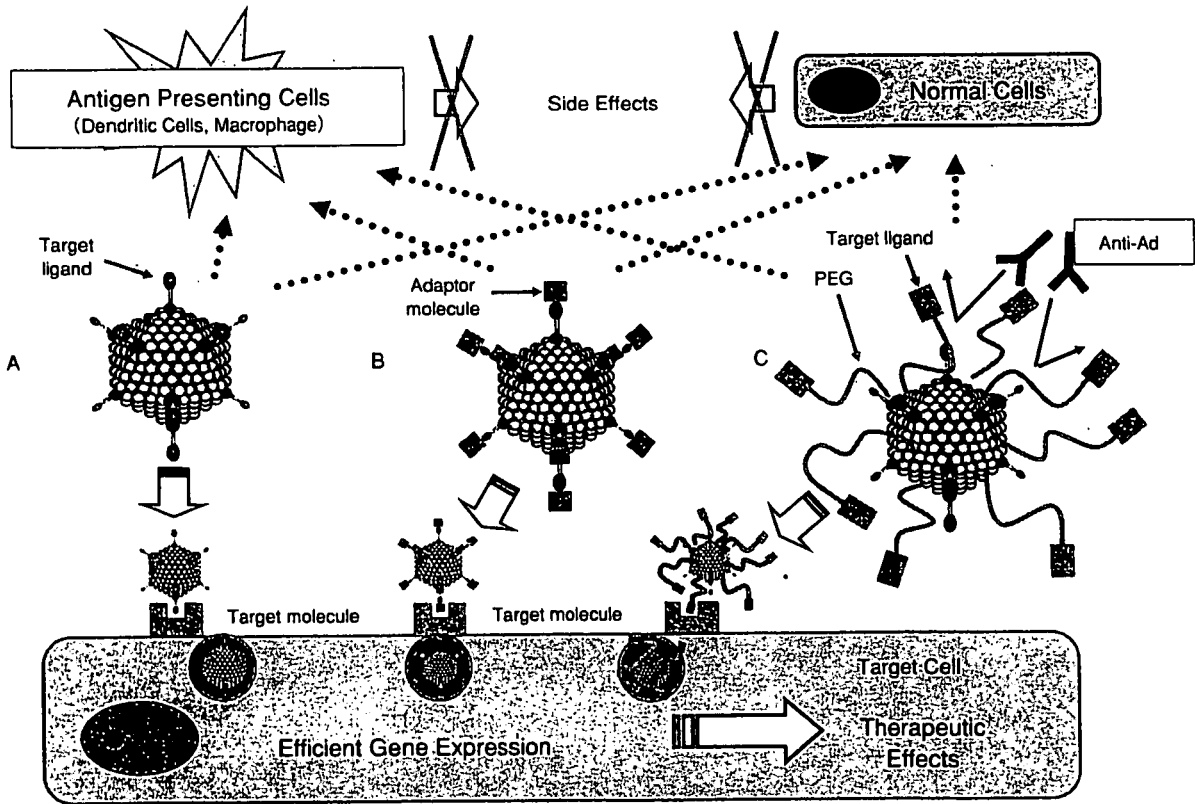
伝子が希釈されることで、一過性の遺伝子発現を示す。一方、分化した増殖停止期の細胞に対しては、アデノウイルスに対する免疫の問題が克服されれば、数ヵ月以上の長期の遺伝子発現を示す³⁾、③他のウイルスベクターに比べ圧倒的に高いタイター（力価）のベクター（通常、他のベクターに比べ1000倍以上）が得られること、などの長所を有し、ベクターとしての優れた基本的性質を有している。

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。

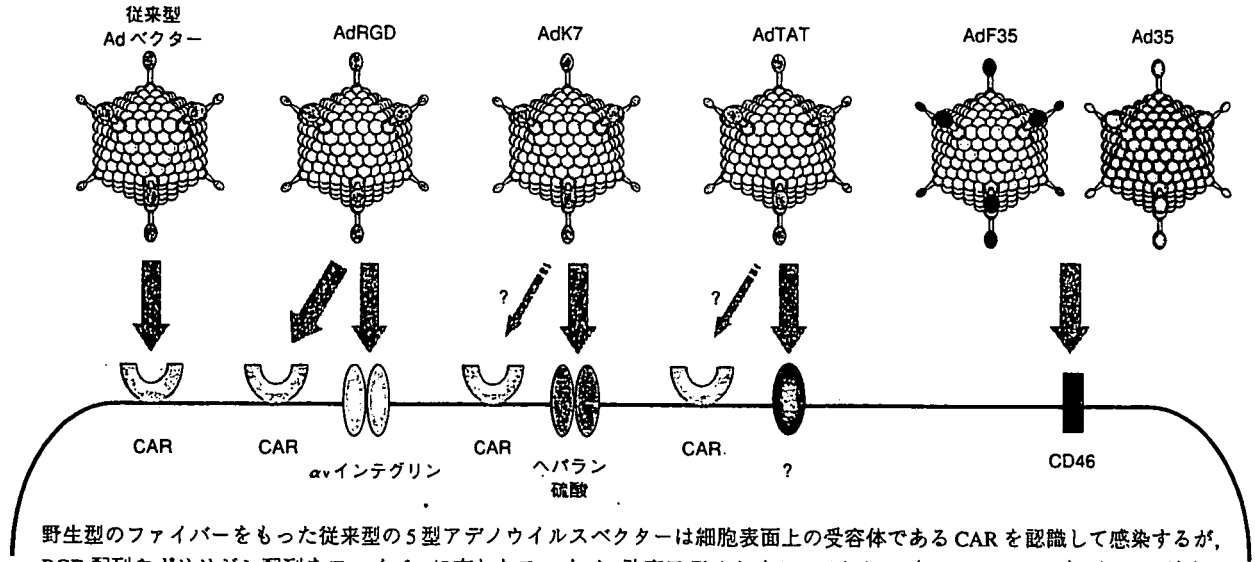
- A. ウィルスカプシドの遺伝子工学的改変
- B. アダプター分子の使用による生化学的改変
- C. リガンドを付与した高分子による化学的改変

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)

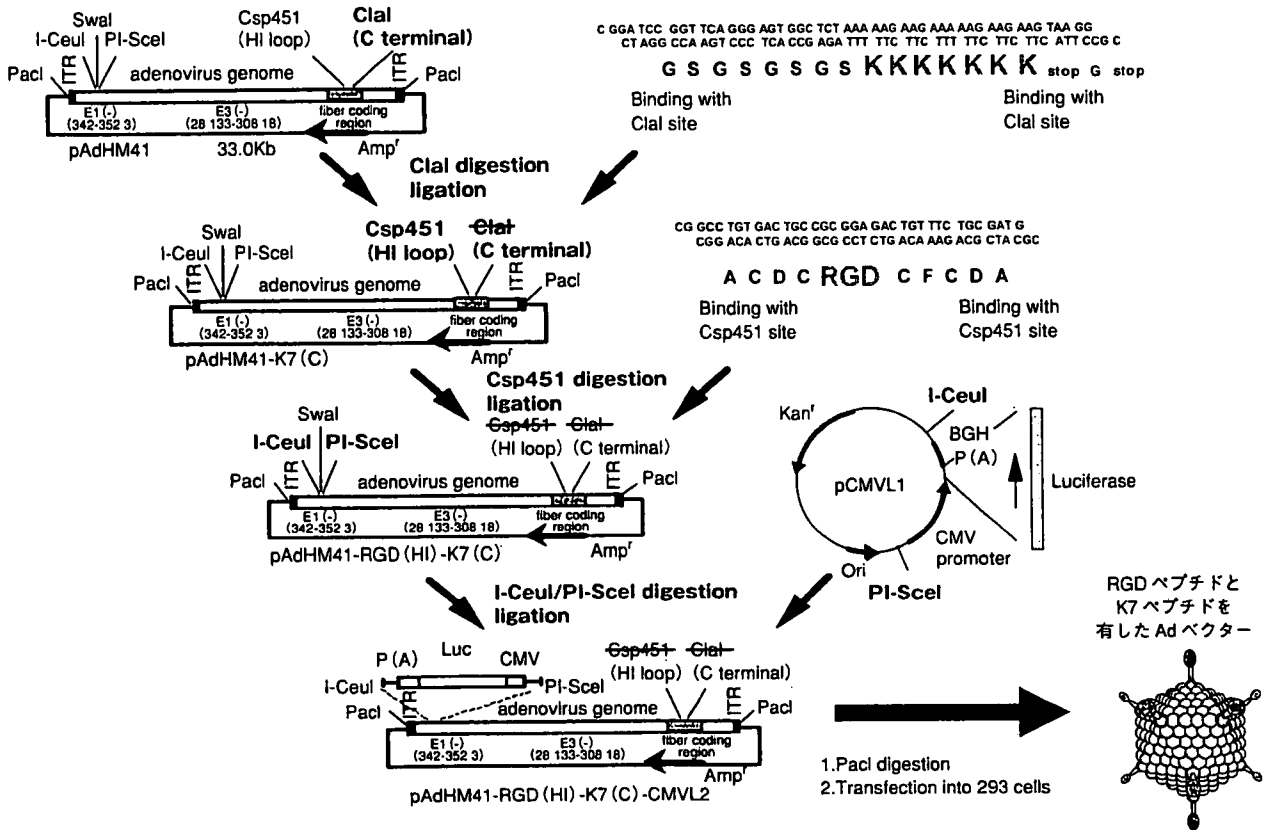
去の総説⁴⁾や共同研究者の倉知らの解説⁵⁾を参照されたい。

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CD46¹⁰⁾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 σ_1 に置き換え、 σ_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6 ファイバー改変アデノウイルスベクター作製法



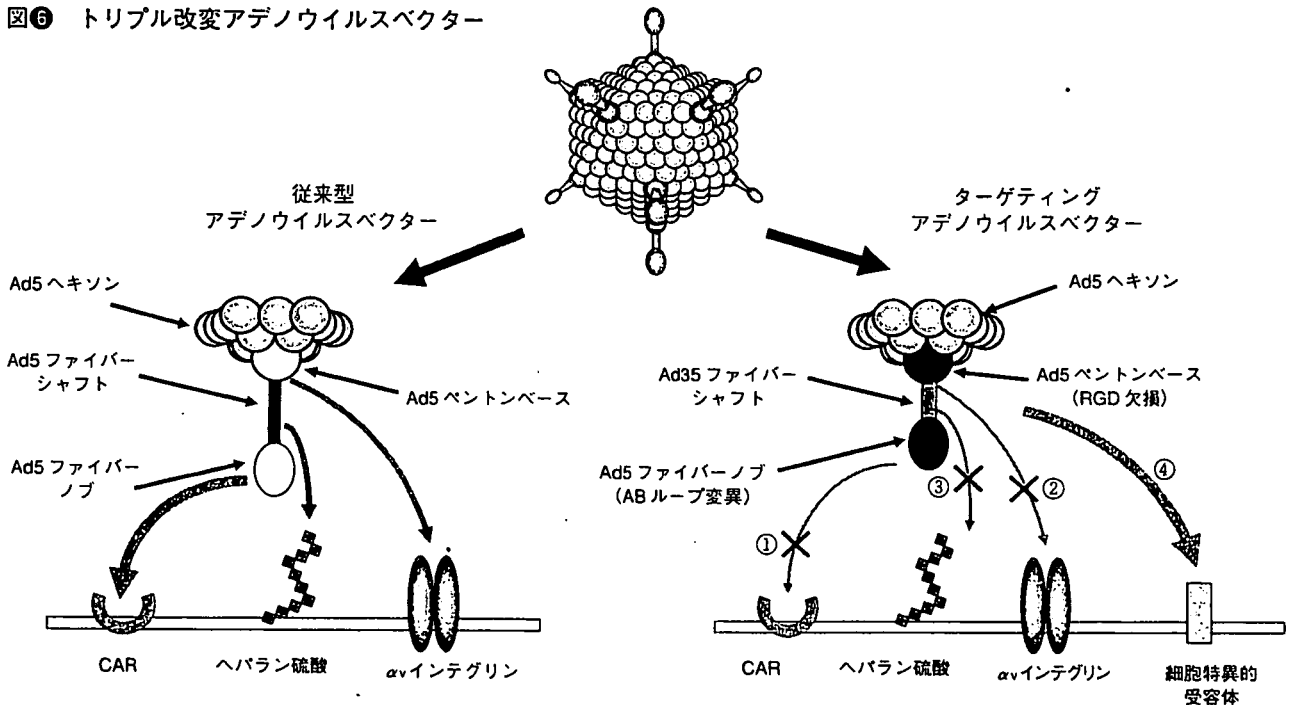
ファイバーノブのHI ループあるいはC末端をコードする遺伝子配列部分にユニークな制限酵素であるCsp45IあるいはClalの切断部位(それぞれ)をもったベクタープラスミドpAdHM41を両酵素で切断し、挿入したいペプチド(この場合RGD配列およびポリリジン配列)に相当する合成オリゴDNAを*in vitro*ライゲーションで導入する。その後、I-CeuIとPI-SceI部位を利用して*in vitro*ライゲーションでルシフェラーゼ遺伝子をE1欠損部位に挿入する。生じたプラスミドをウイルスゲノム両末端に存在するPacl部位で切断し、293細胞にトランスフェクションすると、RGD配列とポリリジン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

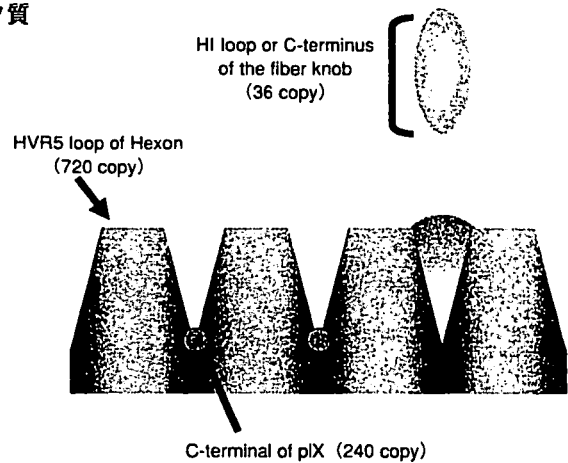
一方、*in vivo*において標的細胞特異的に遺伝子導入可能なターゲティングアデノウイルスベクターの開発も進んでいる。この場合、ネイティブのアデノウイルスがもつ感染能を消失させて、細胞特異的受容体を認識して感染できるように改変を行う必要がある。アデノウイルスは前述のようにファイバーとCARとの結合が感染に重要な役割を果たすが、低親和性であるがペントンベースのRGDモチーフやファイバーシャフトのKKTKモチーフ

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 $\alpha 5$ 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 $\alpha 5$ 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³¹⁾。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* 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、ヒトを含む盤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,

2005.
21) Parker AL, Waddington SN, et al : Blood 108, 2554-2561, 2006.
22) Koizumi N, Mizuguchi H, et al : J Virol 77, 13062-13072, 2003.
23) Koizumi N, Kawabata K, et al : Hum Gene Ther 17, 264-279, 2006.

参考図書

*バイオ医薬品の品質・安全性評価, 早川堯夫, 山崎修道 他編, エル・アイ・シー, 2001.

●水口裕之

- 1991年 大阪大学薬学部薬学科卒業
1996年 大阪大学大学院薬学研究科博士課程修了(薬学博士)
大阪大学微生物病研究所研究員
1997年 米国ワシントン大学医学部 Senior Fellow (Dr. Mark A Kay)
1998年 国立医薬品食品衛生研究所生物薬品部研究員
2002年 同遺伝子細胞医薬部主任研究官
2004年 同大阪支所基盤研究第3プロジェクト副プロジェクト長

- 24) Parks RJ : Mol Ther 11, 19-25, 2005.
25) Wu H, Han T, et al : J Virol 79, 3382-3390, 2005.
26) Kurachi S, Koizumi N, et al : Gene Ther 14, 266-274, 2007.

参考ホームページ

・医薬基盤研究所遺伝子導入制御プロジェクト研究室
<http://www.nibio.go.jp/Proj3HP/index.html>

- 2005年 独立行政法人医薬基盤研究所基盤的研究部遺伝子導入制御プロジェクトプロジェクトリーダー(現在に至る)
大阪大学大学院薬学研究科招へい助教授(連携大学院)
2007年 同招へい准教授(連携大学院)
神戸大学大学院医学研究科客員准教授(連携大学院)

※大学院生(修士課程;連携大学院)を募集中,ご興味のある方は気軽にお問い合わせ下さい。

〈特集1〉次世代バイオ医薬品の開発ノウハウ～TGN1412、その後

1. 次世代バイオ医薬品の開発にあたっての非臨床・臨床試験について — TGN1412 事故が医薬品開発に与えたインパクト —

山口 照英 石井 明子

国立医薬品食品衛生研究所

要旨

作用の種特異性が高く、動物モデルでの評価が困難なバイオ医薬品では、非臨床試験の結果をもとに臨床適用における有効性・安全性について十分な評価を行うことが困難な場合も多い。ヒト CD28 に対するアゴニスト抗体 TGN1412 の臨床試験では、非臨床試験結果に基づいて行われた用量設定が適切でなかった可能性が指摘されている。従来のバイオ医薬品では不足あるいは欠損している生体内成分の補充療法に用いられるものが主流であったが、最近では、疾患との関連が解明された生体機能分子を標的とする新たなコンセプトに基づいて、生体には存在しない構造を持つ非天然型のタンパク質を医薬品とする研究開発が精力的に進められている。天然型のバイオ医薬品が临床上、生理的な濃度範囲となるような用量で投与される場合には、いくつかの非臨床試験については必ずしも要求されるわけではないが、非天然型のタンパク質性医薬品では有効性・安全性のプロファイルは未知であるため、非臨床・臨床試験でそれらを明らかにしていかなければならず、開発過程での課題は多い。TGN1412 のように生理的なりガンド以上に強力に T 細胞を活性化し得るような抗体医薬品は特殊な例ではあるものの、今後、疾患関連遺伝子・タンパク質のさらなる解明に伴い、これまでにないコンセプトに基づく分子標的医薬品として、新規な標的を持つ抗体医薬

品や改変型の抗体を含め各種の改変型タンパク質性医薬品など、ヒトに特異的に作用する医薬品が益々多く開発されてくると予想されることから、その安全性や有効性の評価には新たな視点も必要になるであろう。

臨床試験の実施においては被験者の安全性確保が最優先であることは言うまでもないが、患者のもとに可能な限り速やかに医薬品を届けるためには、科学的に妥当と考えられる非臨床試験を実施し、安全性を十分に検証した上で、適切なタイミングで臨床試験に移行することが重要であると考えられる。非臨床試験の有用性と限界を見極めつつ、安全性に最大限の配慮をしながら有用な医薬品の開発を推進するため、我が国においても、医薬品の開発側、規制側、さらには、アカデミアを交えた議論がより一層深められることが望まれる。

1.1. はじめに

抗体医薬品は、標的分子と特異的に、高い親和性をもって結合する。このことが薬効を発揮する上では重要であるが、ヒトタンパク質を標的とする抗体医薬品の場合、非臨床試験で用いられる動物に存在する相同分子との構造上の違い等から標的分子との結合が弱い、あるいは検出されない場合があり、安全性を評価するための非臨床試験系の有用性がしばしば問題となる。標的分子に対する高い特異性は、タンパク質性医薬品（バイオ医薬品：注1）に共通した

特徴であるが、インスリンや成長ホルモンのように補充療法に用いられる古典的なバイオ医薬品は、生体内タンパク質と同一あるいは同等の構造を持つタンパク質として製造されたものであるため、その有効性・安全性のプロファイルは天然のタンパク質の特性をもとに、ほぼ明らかであると考えることができた。しかし、近年開発がさかんなキメラ型抗体、ヒト化抗体、各種の融合タンパク質や改変タンパク質などの天然に存在しない構造を持つタンパク質性医薬品では、有効性・安全性プロファイルが未知であるため、非臨床試験さらには臨床試験を通じて明らかにしていくことが求められる。

バイオ医薬品の非臨床試験における安全性評価では、目的タンパク質の構造の多様性や不均一性、作用発現の動物種特異性、免疫原性など、バイオ医薬品の物性面や作用面での特徴・特殊性からみて、従来の医薬品（特に化学合成医薬品）において実施される定型的な非臨床安全性試験の種類・項目および試験方法をそのまま機械的に適用することは妥当ではなく、従来とは異なる観点や方法で試験を実施すべき場合が多い¹⁾。バイオ医薬品の非臨床試験をどのように行い、ヒトへの投与にあたって安全性を担保していくかについては、これまでも議論が重ねられ、一般原則を記載した国際調和ガイドラインも作成されている²⁾。しかし、過去に例のない惨事となったTGN1412の事故は、作用の種特異性が高いアゴニスト抗体医薬品の評価の難しさを、世界中に強烈に印象づけることとなった。

一般に、化学薬品では、濃度によっては標的分子以外へ作用を示すものも多いことから、有害反応の主な原因が off-target 効果であることが少なくないのに対して、抗体医薬品などのバイオ医薬品では、標的分子との結合特異性が非常に高いため、有害反応の主な原因は on-target 効果であるとされている³⁾。すなわち、バイオ医薬品の安全性を考える際には、その生物学的性質や薬理作用に関する十分な理解が必須である。TGN1412の例においても、有害反応の原因

はTGN1412の生物学的な作用にあるとされ、標的分子を介した反応がサイトカイン放出症候群につながったと考えられている⁴⁾。しかし、重篤な例は稀であるが、サイトカイン放出症候群はこれまでに他の抗体医薬品でも生じている^{5,6)}。TGN1412の開発にあたって、過去の知見に基づいてサイトカイン放出症候群の危険はどのように考えられていたであろうか。また、他の抗体医薬品で報告されているサイトカイン放出症候群とはどのような違いがあったのか。

TGN1412の臨床試験に関してはすでに多くの専門家から解説がなされているが、本稿では、バイオ医薬品の特性と品質・安全性確保に関心を寄せている立場から、TGN1412の特性と他の抗体医薬品との比較に基づき、改めてTGN1412の事故を振り返ると共に、TGN1412による有害事象発生の原因検証とその後の議論をもとに欧州医薬品庁から公表された“ヒト初回投与試験におけるリスク要因の同定およびリスク低減のための方策に関するガイドライン”を紹介し、この事故を教訓にした今後の非臨床・臨床試験のあり方を考察する。

1.2. 抗体医薬品とサイトカイン放出症候群

TGN1412に関する各種の資料から、TGN1412の臨床試験で生じたサイトカイン放出症候群は、次のようなものであったと考えられる。

- (1) TGN1412の開発では、過去の知見に基づき、サイトカイン放出症候群発生のリスクに関する配慮はなされていたものの、動物とヒトでの標的分子との親和性の差や反応性の相違が十分考慮されず、CD28の占有率が90%にもなる用量が投与された結果、生理的に制御が可能な範囲を超えてT細胞やエフェクター細胞が活性化され、重度のサイトカイン放出症候群が生じたと推察される。(後述 1.2.1.~1.2.6.参照)
- (2) 臨床試験後に、TGN1412をプレートへ固定化することにより *in vitro* でTGN1412の生物活性を検出できる試験系が確立された。確立された試験法を用いた検討により、ヒトとカニク

イザルのリンパ球では TGN1412 への反応性に相違があり、カニクイザルのリンパ球では TGN1412 単独の刺激では細胞増殖やサイトカイン産生が起こらないことが示された。また、ヒトリンパ球では、TGN1412 の薬理作用である細胞増殖と、有害作用である炎症性サイトカイン放出がほぼ同じ濃度領域で検出された。これらのことから、非臨床試験の段階で TGN1412 の生物活性について、ヒトやサル細胞を用いた適切な試験系による解析が行われていれば、臨床試験での有害事象発生を予測できた可能性もあると考えられる。(後述 1.2.7.参照)

これらの考察に基づき、T細胞を活性化させる作用を持つ抗体医薬品、あるいは、Fc γ 受容体を介してエフェクター細胞を活性化させる作用を持つ抗体医薬品では、今後もサイトカイン放出症候群に対する慎重な対応が必要であると考えられる。また、バイオ医薬品の安全性を考える上では、医薬品の生物活性や薬理作用に対する理解を深めることが重要であり、臨床での薬効や毒性を予測するためには、ヒト細胞や組織を用いた試験系の利用・開発が有効であると考えられる。

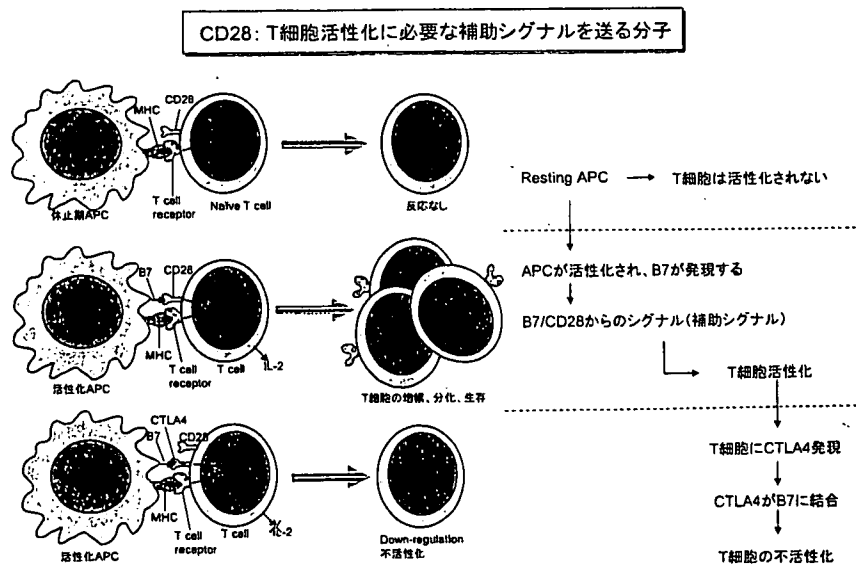
以下に、これらの考察の根拠となる知見を紹介する。

介する。

1.2.1. TGN1412 の特性

TGN1412 は、ヒト化抗ヒト CD28 抗体 (注2) で、T細胞表面分子 CD28 に結合する。サブクラスは IgG4 (注3)。T細胞が抗原提示細胞 (APC) から抗原提示を受けて活性化されるには、T細胞受容体 (TCR) が抗原を認識すると共に、抗原提示細胞上の B7 (CD80, CD86) と T細胞上の CD28 が結合し、CD28 を介した補助シグナルが惹起されることが必要である (図1, 2)⁷⁾。TGN1412 は、アゴニスト活性を持つことが大きな特徴であり、生理的な T細胞活性化経路とは異なり、単独で CD28 を介して T細胞を活性化することができるとされている^{8,9)}。

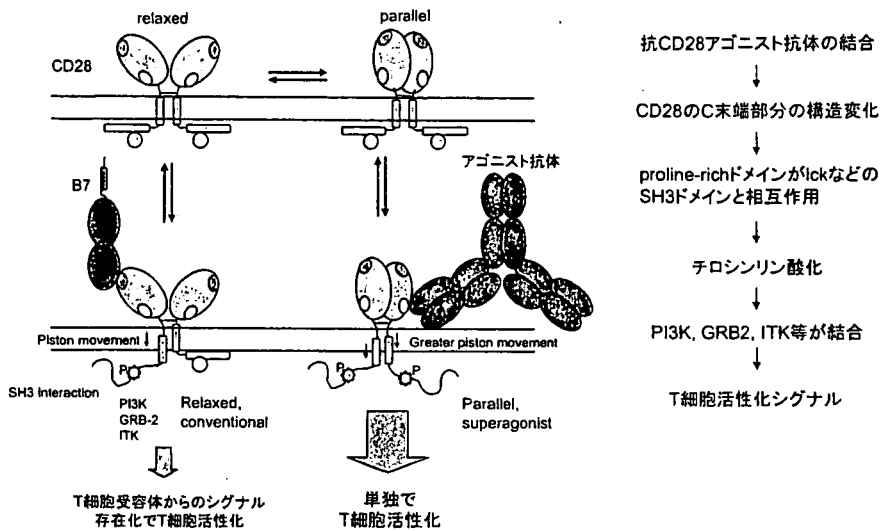
TGN1412 の適応疾患としては、B細胞性慢性リンパ性白血病 (B-CLL) と関節リウマチが考えられていた¹⁰⁾。T細胞の数と機能が低下している B-CLL においては、TGN1412 による T細胞の増殖と活性化の促進、および、CD40/CD40L 経路を介して間接的に B7 の発現を増強することにより、B細胞リンパ腫の抗原提示能を改善し、腫瘍特異的 T細胞の誘導を促すことよって奏功するとされていた。一方、関節リウマチで



<Arlene H et al. New Eng. J. Med. 355, 973, 2006より改変>

図 1

TGN1412によるCD28活性化機構



<Margulies DH J. Exp. Med. 197, 949, 2003より改変>

図2

CD28 を介した T 細胞活性化のシグナルとしては、生理的リガンドである B7 の結合により CD28 の細胞内ドメインの構造が変化してプロリンリッチドメインが露出し、SH3 ドメインを持つ Lck などの kinase によって CD28 のチロシン残基のリン酸化が起こること、これにより PI3K、Grb-2、Itk などが CD28 に結合可能となり、続いて、それぞれの基質のリン酸化やアダプタータンパクとの結合によりシグナルが伝達され、NF- κ B、NFAT、AP-1 などの転写因子の活性化が起こることが知られている (Sharpe AH and Freeman GJ, *Nat. Rev. Immunol.* 2, 116, 2002)。TGN1412 は、B7 と異なり、CD28 の細胞膜貫通部位近傍の C-D ループに結合し、CD28 をクロスリンクすることにより CD28 を活性化することができるとされている (Beyersdorf N: et al. *Ann. Rheum. Dis.*, 64, iv91, 2005)。このときにおこる CD28 の細胞内ドメインの構造変化が B7 が結合したときよりも大きく、Lck 以外の kinase が働くなど、より多くの情報伝達関連タンパク質のアクセスが可能となることにより、TCR からのシグナルがなくても T 細胞を活性化することができると考えられている (Margulies DH, *J. Exp. Med.* 197, 949, 2003)。

は、IL-4、IL-10 などの抗炎症性サイトカインの誘導と、自己反応性 T 細胞をコントロールし得る調節性 T 細胞の増殖により奏功するとされていた。これら、CD28 の活性化により疾患を治療するというコンセプトは新規なものであり、臨床試験を経て、その有用性が示されていくはずであった。

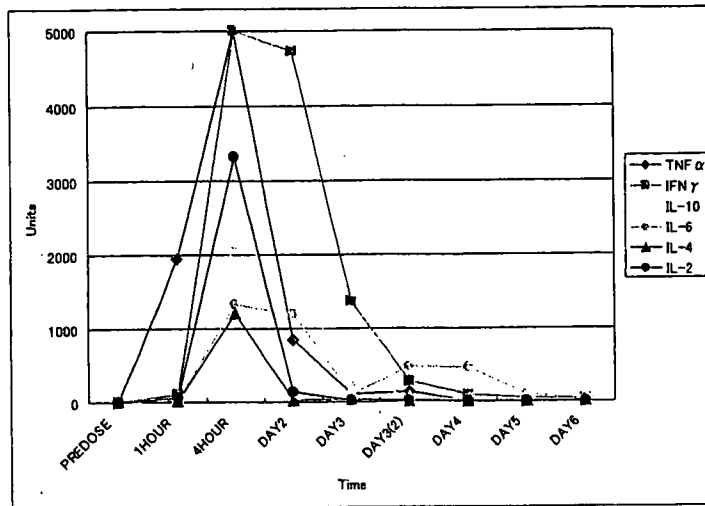
1.2.2. TGN1412 の臨床試験

健常人を対象とした TGN1412 の初回臨床試験は、2006 年 3 月 13 日、ロンドンの Northwick Park 病院で行われた。0.1 mg/kg の TGN1412 を静脈内投与された被験者 6 人全員に重度のサイトカイン放出症候群が生じ、多臓器不全に陥った。症状は極めて重篤であったが、主とし

て免疫抑制を目的とした投薬 (hydrocortisone、methylprednisolone、抗 IL-2 受容体抗体 daclizumab 等) と、血液透析、血漿交換などの処置により救命された¹¹⁾。

血液検査の結果では、すべての患者で投与 4 時間後までに、TNF α の急激な増加と、それに続く IL-2、IL-6、IL-10、IFN γ 等の増加が認められている (図 3)⁴⁾。サイトカイン放出は、hydrocortisone や methylprednisolone 等の投与により改善され、ほぼ 3 日以内に低値になっている。また、TGN1412 投与直後から重度の血小板減少、リンパ球減少、単球減少が認められており、CD3⁺、CD4⁺、CD8⁺ T 細胞は、投与 24 時間後まで測定限界以下となっている¹¹⁾。

TGN1412を投与された被験者の血中サイトカイン濃度



<Expert Scientific Group Final Report (P.36)をもとに作成>

図 3

表 1

臨床試験後に実施されたTGN1412の品質評価

開発企業により定められた規格試験

- 紫外吸光度測定
- エンドトキシン試験(LALゲル化法)
- SDS-ポリアクリルアミド電気泳動
- 等電点電気泳動
- サイズ排除高速液体クロマトグラフィー
- 細胞結合性試験(BIAcore)
- 生菌数試験
- 無菌試験

規格試験以外の試験

- ウサギ発熱性物質試験
- 異常毒性試験(英国薬局方)
- Toxicity Screen (FDA's Forensic Chemistry Centre)

<Expert Scientific Group Final Report (P.40)をもとに作成>

1.2.3. TGN1412 臨床試験の問題

TGN1412の臨床試験後、目的の構造や生物活性を持つタンパク質が作られていたか、汚染物質の混入はなかったか等について、あらためて治験薬の品質を確かめる試験が行われた(注4)(表1)。その結果、試験結果に問題はなく、エンドトキシン、発熱性物質、微生物その他の混

入は認められなかったとされ、事故の原因は、品質特性解析や非臨床試験では予測されなかったTGN1412の生物学的な作用にあったとされた⁹⁾。

非臨床試験結果から予測されなかった有害事象がヒト初回投与試験で生じた原因としては、用量と投与方法が適切でなかった可能性が指摘されている^{12, 13)}。TGN1412の初回臨床投与量は、FDAガイダンス案“Estimating the safe starting dose in clinical trials for therapeutics in adult healthy volunteers”を参考に、最大無毒性量(No Observed Adverse Effect Level: NOAEL)を基準に決定された¹⁰⁾。すなわち、カニクイザルを用いた28日間反復投与実験の高用量群に投与された50 mg/kgをNOAELとし、allometric correction factorとして3.1を用いてhuman equivalent dose (HED)を16 mg/kg、safety factorとして160を用いて、0.1 mg/kgと算出されている。しかし、TGN1412を投与されたカニクイザルでは低用量群、高用量群ともに、炎症性サイトカインIL-6の濃度上昇がみられているため(表2)、これが薬理作用でなく有害作用であると考え、NOAELを50 mg/kgとしたことが適切でなかった可能性も考えられ

表 2

TGN1412を投与されたカニクイザルの血中サイトカイン濃度

Cytokine	Inflammatory type	Mean peak cytokine concentration (range) in pg/ml		
		Control	Low dose (5mg/kg)	High dose (50mg/kg)
IL-2	Pro-inflammatory	37 (20-60)	25 (0-84)	100 (25-211)
IL-4	Anti-inflammatory	12 (0-18)	13 (8-18)	17 (0-40)
IL-5	Anti-inflammatory	6 (3-7)	49 (6-139)	107 (11-458)
IL-6	Pro-inflammatory	7 (0-22)	68 (32-101)	128 (24-390)
TNF α	Pro-inflammatory	20 (11-26)	20 (15-27)	22 (19-26)
IFN γ	Pro-inflammatory	18 (0-35)	23 (19-32)	33 (17-93)

< 治験薬概要書 (P.46) , Kenter MJH and Cohen AF *Lancet* 368, 1387, 2006 をもとに作成 >

る¹²⁾。さらに、公開された治験薬概要書などにヒトとカニクイザルにおける TGN1412 と CD28 の親和性や反応性の差異に関する記載がないことから、用量設定のための試験系や結果の解釈が妥当でなかった可能性は否定できないであろう。

投与方法に関して、治験計画では、short-term infusion により TGN1412 を投与するとされており、2 mg/ml に希釈した製剤を 1～5 ml/min で投与することとされているため、0.1 mg/kg を体重 70 kg のヒトに投与する場合は、0.7～3.5 分で投与するプロトコルとなっていた¹⁰⁾。一方、カニクイザルを用いた実験では、1 時間以上をかけて点滴静注するプロトコルとなっている¹⁰⁾。非臨床試験と臨床試験で異なる投与方法が採用された理由は不明であるが、抗体医薬品によるサイトカイン放出症候群は、注入速度に依存して起こりやすいことが知られているため¹⁴⁾、投与速度が高すぎたことがサイトカイン放出症候群が起こった原因の一つである可能性も考えられる。

1.2.4. 抗体医薬品の有害反応としてのサイトカイン放出症候群

サイトカイン放出症候群は、抗体医薬品によ

る有害反応の一つとして認識されていたリスクであるが、通常は軽度～中程度であり、抗炎症薬や解熱薬の投与、あるいは、投与量の漸増、投与速度の制限などによりコントロールされている^{5,6)} (注5)。しかし、稀に重度のサイトカイン症候群が生じることがあり、抗 CD3 抗体 Muromonab-CD3、抗 CD20 抗体 Rituximab、抗 CD52 抗体 Alemtuzumab では、サイトカイン放出症候群による死亡例が報告されている^{5,6)}。

抗 CD3 抗体 Muromonab-CD3 により生じるサイトカイン放出症候群には、

- CD3 および Fc γ 受容体との結合を介した T 細胞の活性化
- Fc γ 受容体との結合を介したエフェクター細胞の活性化

の 2 つの機構が関与していると考えられている¹⁵⁻¹⁸⁾。

Muromonab-CD3 は、T 細胞受容体複合体の構成要素である CD3 に結合し、T 細胞受容体をインターナリゼーションさせることにより T 細胞の活性化を抑制するが、CD3 に結合した際、一時的に T 細胞を活性化し、サイトカイン放出を起こすことが知られている¹⁷⁾。すなわち、Muromonab-CD3 は目的外の作用としてアゴニスト活性を併せ持つ抗体であると言える。

Muromonab-CD3はFc部分を介してFc γ 受容体とも結合する。Fc γ 受容体との結合は、CD3のクロスリンクによるT細胞活性化に関与すると共に、Fc γ 受容体を発現しているエフェクター細胞の活性化も引き起こす。活性化されたエフェクター細胞からもサイトカインが放出されるため、T細胞とエフェクター細胞から放出されたサイトカインにより、サイトカイン放出症候群が生じると考えられている。Muromonab-CD3の初回～第3回の投与時には、ほとんど全ての患者でインフルエンザ様症状を示す軽度のサイトカイン放出症候群が起こるとされている。腎移植の急性拒絶反応の臨床試験においては、Muromonab-CD3投与後、サイトカイン放出が関与すると考えられる致命的な肺浮腫が生じた割合は、2%以下であった¹⁹⁾。Muromonab-CD3は臓器移植の際の免疫抑制に用いられるため、他の免疫抑制薬が併用される場合が多いが、methylprednisoloneの前投与を受けなかった患者で、TNF α の上昇がより顕著となる傾向がある²⁰⁾。

一方、抗CD20抗体Rituximabおよび抗CD52抗体Alemtuzumabにより生じるサイトカイン放出症候群には、

-Fc γ 受容体との結合を介したエフェクター細胞の活性化

が関与しているとされている^{21,22)}。すなわち、活性化されたエフェクター細胞から放出されるサイトカインにより、サイトカイン放出症候群が生じると考えられている。注5に記載したように、これらの医薬品ではサイトカイン放出症候群はinfusion reactionの一因としての位置づけとなっており、infusion reactionが生じた例のうち、どの程度がサイトカイン放出が関与するものかは不明であるが、Rituximabでは発熱等のinfusion reactionが生じる頻度は約90%²³⁾となっている。重篤な例は一部に限られ、Rituximabが米国で上市された1年後の1998年12月に出されたDoctor Letterによると、Rituximabを投与された患者12,000～14,000人のうち、重篤

な (serious) infusion-related eventsが70例で生じ、死亡した8例中7例では初回投与時に重篤な症状が生じたと報告されている。Alemtuzumabでは発熱等のinfusion reactionが生じる頻度は83%²⁴⁾とされ、149人のB細胞慢性白血病患者を対象とした治験では、Grade3～4の有害事象が生じた割合は、発熱については19%、硬直については16%、低血圧については5%とされている。

1.2.5. TGN1412の開発過程で、サイトカイン放出症候群に対する配慮がなされていたか

上記の知見から考えると、

- T細胞を活性化しない
- Fc γ 受容体と結合しない (エフェクター細胞を活性化しない)

ことが、抗体医薬品投与に伴うサイトカイン放出症候群の回避につながると思われる。

TGN1412の薬効発現においてはT細胞を活性化することが重要であるため、T細胞の活性化作用をなくすことはできない。しかし、Muromonab-CD3を投与されたチンパンジーでTNF α とIFN γ を含めた炎症性サイトカインの放出が起ったことが報告されている²⁵⁾のに対して、TGN1412を投与されたカニクイザルではTNF α およびIFN γ の放出が検出されなかったことを根拠として、TGN1412の開発過程では、TGN1412のT細胞活性化作用はサイトカイン放出症候群につながらないと判断されていた¹⁰⁾。

TGN1412の薬効発現においてエフェクター細胞の活性化は不要であるので、Fc γ 受容体との結合はなくてもよいはずである。すなわち、血中半減期が短くなるという問題は生じるが、Fcドメインを持たないF(ab)²として開発することも一案であったと思われる。しかし、Investigational Medicinal Product Dossierには、TGN1412の生物活性発現には、Fc/Fc受容体を介したCD28のクロスリンクが必要であり、Fc部分を除いたF(ab)²ではT細胞の増殖が起

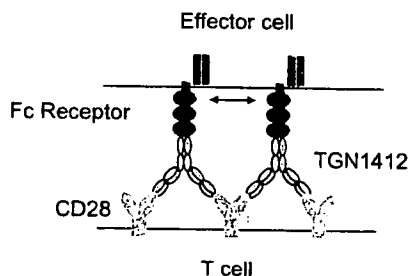
こらなかつたと記載されている (図4)²⁶⁾。

TGN1412の場合、Fcドメインが必須であるとしても、エフェクター細胞の活性化作用は極力ないことが望ましい。この点について、IgGのサブクラスとして、エフェクター活性の低いIgG4を選択している点では、配慮はされていたと考えられる。治験薬概要書には、TGN1412のIgG1バリエーションであるTGN1112とTGN1412について、エフェクター活性を比較した結果が記載されている (図5)。この試験では、サイ

トカイン放出症候群を起こすことが知られているAlemtuzumabをポジティブコントロールとして用いて両抗体のADCC活性とCDC活性が検討されており、TGN1412はADCC活性、CDC活性を示さず、TGN1112はADCC活性を示したと記載されている。一方、薬理活性はTGN1112の方が高かったと記載されている。したがって、目的外の作用であるADCC活性を持たないことを重視して、あえて薬理活性の低いTGN1412を選択したと考えることができる。

TGN1412の生物活性発現におけるFc領域の必要性

Since F(ab)₂ fragments of agonistic anti-CD28 antibodies were not capable to induce a proliferative T cell response, an intact Fc-region appears to be required for TGN1412 biological activity. Experiments with highly purified T cells and Fc-receptor binding studies underlined the notion that cross-linking via Fc-receptor(s) is required for efficient TGN1412-mediated triggering of T cells.



<Investigational Medicinal Product Dossier (P.111)をもとに作成>

図4

TGN1412 (IgG4)とTGN1112 (IgG1)の活性比較

	標的	サブクラス	CDC hPBMC	ADCC Jurkat CD28+, CD52+	ADCC Jurkat CD28+, CD52-
Alemtuzumab	CD52	IgG1	+	+	-
TGN1112	CD28	IgG1	-	+	+
TGN1412	CD28	IgG4	-	-	-

CDC: 補体依存性細胞障害
ADCC: 抗体依存性細胞障害

アカゲザル リンパ球の活性化 (ex vivo): TGN1112 > TGN1412

<治験薬概要書 (P.30, 36)をもとに作成>

図5