

このようなベクターでは分裂細胞においても永続的な遺伝子発現が期待できる。

2. レトロウイルスベクターおよびレンチウイルスベクター

レトロウイルスベクターやレンチウイルスベクターは、導入遺伝子を積極的に染色体に組み込ませ、長期の遺伝子発現が可能になるベクターであるが、導入遺伝子が癌遺伝子の近傍に挿入された場合には、遺伝子毒性(発癌性など)を示す可能性があることは1990年代から指摘されていた。しかしながら、実際に遺伝子毒性を示した実験例が、前臨床試験を含めてほとんどなかったため軽視されていた。X-SCID 遺伝子治療適用患者での白血病発症をきっかけに、レトロウイルスベクターの染色体挿入部位の解析に関する技術開発が一挙に進み、現在では染色体挿入部位に関する厳重なモニタリングが可能になり、万一異常な細胞が出現した場合には、早期に対処できるようになっている。また、自殺遺伝子を同時に組み込むことで、万一遺伝子導入細胞が癌化しても、異常細胞を除去できるような系も開発されている。

ベクターに関する進歩としては、特にレンチウイルスベクターにおいて、エンベロープを変更したシュードタイプベクターの開発が進んでいる。レンチウイルスベクターは、通常、感染域を広げるとともに物理化学的に安定にするために、エンベロープを水泡性口内炎ウイルスG糖タンパク質(vesicular stomatitis virus G glycoprotein: VSV-G)に変更されているが、これをエボラウイルスやセンダイウイルス、コロナウイルス(severe acute respiratory syndrome coronavirus)などの他のウイルス由来のエンベロープに置き換え、感染域を変更したベクターが開発されている¹⁹⁾。また最近では、インテグラーゼに変異を導入して、染色体への遺伝子挿入能を消失させたレンチウイルスベクターも開発されている²⁰⁾。

3. アデノ随伴ウイルスベクター

AAVベクターもアデノウイルスベクターと同様に、他の血清型由来のベクター(従来のAAVベクターは1~5型、特に2型が一般的であった)の開発や、ウイルスカプシドタンパク質に外来ペプチドを挿入して感染域を変更するベクターが開

発されている。特に8型AAVベクターは、静脈内投与した場合には、ほぼ全身の細胞に遺伝子導入されることから^{23),24)}、筋ジストロフィーなどへの遺伝子治療への適応が期待されている。また、従来のAAVベクターは、1本鎖DNAをゲノムとして有しているが、遺伝子発現に至るためには標的細胞内で2本鎖DNAになる必要があるため、発現効率がやや低いのが課題であった。そこで、inverted terminal repeats (ITR: ウイルスゲノム両末端に存在し、ウイルスゲノムの複製の際に複製起点になる領域)を変異させることで、2本鎖DNAをゲノムとして有したAAVベクターが開発され、発現効率の上昇が可能になっている。(逆にパッケージングできる外来遺伝子のサイズが従来型ベクターの1/2の約2.3kbが上限になった)²⁵⁾。

4. その他の技術革新

究極的な遺伝子治療は、相同組み換えによりエラーのある遺伝子配列を正常な遺伝子配列に修復させることである。しかしながら、動物細胞における相同組み換えの効率は極めて低いため、これまで行われてきた遺伝子治療は全て、エラーのある遺伝子配列の修復は無視して、正常な遺伝子配列を(エラーのある遺伝子配列部分とは異なった部分に)付加したものである。米國サンガモ・バイオサイエンス社は、ジンク(亜鉛)フィンガーDNA結合タンパク質を利用することで、相同組み換えの効率を飛躍的に高める技術の開発に成功した²⁶⁾。彼らの開発したジンクフィンガーDNA結合タンパク質は、特定のDNA配列を認識するDNA結合ドメインと遺伝子修復のための機能ドメイン(スクレアーズドメイン)からなり、目的DNA配列を切断し、染色体外DNA供与体との相同組み換えを促進することにより、特定のDNA配列を修復する活性を有する。モデルとしてX-SCIDの原因遺伝子のγc鎖遺伝子の修復を試みたところ、18%のT細胞で選択なしに遺伝子修飾が認められ、7%の細胞で遺伝子修復および正常タンパク質の産生が確認された²⁶⁾。X-SCID 遺伝子治療への応用が期待されるとともに、βサラセミア(グロビンのβ鎖の合成欠損により、正常成人ヘモグロビンの産生異常を起こす疾患)のように、異常なタンパク質(赤血球)を産生することが

疾病の原因となっているような疾患に対する遺伝子治療（正常タンパク質を産生するように異常遺伝子部分を相同組換えにより修復することによる遺伝子治療）も可能になるかもしれない。本技術は、ジンクフィンガー DNA 結合タンパク質の機能ドメインを変えることで、遺伝子発現の on/off 制御や、特定遺伝子の破壊も可能であり、応用範囲が広いことも特徴である。

7 おわりに

遺伝子治療は当初期待された程の治療効果があった症例は限られており、現在は、もう一度基礎研究に戻って、より優れた基盤技術開発（ベクター開発など）に関する研究に重点が置かれている段階である。本稿で取り上げたような地道な技術開発の積み重ねにより、遺伝子治療が成功に導かれることを期待したい。

文 献

- 1) Cavazzana-Calvo M, et al: Gene therapy of human severe combined immunodeficiency (SCID)-X1 disease. *Science* **288**: 669-672, 2000.
- 2) Hacein-Bey-Abina S, et al: Sustained correction of X-linked severe combined immunodeficiency by ex vivo gene therapy. *N Engl J Med* **346**: 1185-1193, 2002.
- 3) Ott MG, et al: Correction of X-linked chronic granulomatous disease by gene therapy, augmented by insertional activation of MDS1-EVI1, PRDM16 or SETBP1. *Nat Med* **12**: 401-409, 2006.
- 4) Hacein-Bey-Abina S, et al: A serious adverse event after successful gene therapy for X-linked severe combined immunodeficiency. *N Engl J Med* **348**: 255-256, 2003.
- 5) Hacein-Bey-Abina S, et al: LMO2-associated clonal T cell proliferation in two patients after gene therapy for SCID-X1. *Science* **302**: 415-419, 2003.
- 6) Peng Z: Current status of gene therapy in China: recombinant human Ad-p53 agent for treatment of cancers. *Hum Gene Ther* **16**: 1016-1027, 2005.
- 7) Heise C, et al: ONYX-015, an E1B gene-attenuated adenovirus, causes tumor-specific cytolysis and antitumoral efficacy that can be augmented by standard chemotherapeutic agents. *Nat Med* **3**: 639-645, 1997.
- 8) Snyder RO, et al: Correction of hemophilia B in canine and murine models using recombinant adeno-associated viral vectors. *Nat Med* **5**: 64-70, 1999.
- 9) Kay MA, et al: Evidence for gene transfer and expression of factor IX in haemophilia B patients treated with an AAV vector. *Nat Genet* **24**: 257-261, 2000.
- 10) Manno CS, et al: AAV-mediated factor IX gene transfer to skeletal muscle in patients with severe hemophilia B. *Blood* **101**: 2963-2972, 2003.
- 11) Manno CS, et al: Successful transduction of liver in hemophilia by AAV-Factor IX and limitations imposed by the host immune response. *Nat Med* **12**: 342-347, 2006.
- 12) Kaplitt MG, et al: Safety and tolerability of gene therapy with an adeno-associated virus (AAV)-borne GAD gene for Parkinson's disease: an open label, phase I trial. *Lancet* **369**: 2097-2105, 2007.
- 13) Mizuguchi H, Hayakawa T: Targeted adenovirus vectors. *Hum. Gene Ther* **15**: 1022-1033, 2004.
- 14) Palmer DJ, Ng P: Helper-dependent adenoviral vectors for gene therapy. *Hum Gene Ther* **16**: 1-16, 2005.
- 15) Koizumi N, et al: Fiber-modified adenovirus vectors decrease liver toxicity through reduced interleukin 6 production. *J Immunol* **178**: 1767-1773, 2007.
- 16) Yant SR, et al: Transposition from a gutless adeno-transposon vector stabilizes transgene expression *in vivo*. *Nat Biotechnol* **20**: 999-1005, 2002.
- 17) Ehrhardt A, et al: Somatic integration from an adenoviral hybrid vector into a hot spot in mouse liver results in persistent transgene expression levels *in vivo*. *Mol Ther* **15**: 146-156, 2007.
- 18) Kubo S, et al: L1 retrotransposition in nondi-

- viding and primary human somatic cells. Proc Natl Acad Sci USA **103**: 8036-8041, 2006.
- 19) Watson DJ, et al.: Targeted transduction patterns in the mouse brain by lentivirus vectors pseudotyped with VSV, Ebola, Mokola, LCMV, or MuLV envelope proteins. Mol Ther **5**: 528-537, 2002.
- 20) Kobayashi M, et al.: Pseudotyped lentivirus vectors derived from simian immunodeficiency virus: SIVagm with envelope glycoproteins from paramyxovirus. J Virol **77**: 2607-2614, 2003.
- 21) Kobinger GP, et al.: Human immunodeficiency viral vector pseudotyped with the spike envelope of severe acute respiratory syndrome coronavirus transduces human airway epithelial cells and dendritic cells. Hum Gene Ther **18**: 413-422, 2007.
- 22) Yáñez-Muñoz RJ, et al.: Effective gene therapy with nonintegrating lentiviral vectors. Nat Med **12**: 348-353, 2006.
- 23) Wang Z, et al.: Adeno-associated virus serotype 8 efficiently delivers genes to muscle and heart. Nat Biotechnol **23**: 321-328, 2005.
- 24) Nakai H, et al.: Unrestricted hepatocyte transduction with adeno-associated virus serotype 8 vectors in mice. J Virol **79**: 214-224, 2005.
- 25) Wang Z, et al.: Rapid and highly efficient transduction by double-stranded adeno-associated virus vectors *in vitro* and *in vivo*. Gene Ther **10**: 2105-2111, 2003.
- 26) Urnov FD, et al.: Highly efficient endogenous human gene correction using designed zinc-finger nucleases. Nature **435**: 646-651, 2005.



薬物受容体と疾患 ～薬物治療の理論と実際～

大阪医科大学薬理学教室教授 宮崎 端夫 編

B5判 192頁 定価 3,990円(本体 3,800円+税5%)送料実費

ISBN4-7532-1954-2 C3047

おもな内容

- I. 薬物受容体概論
- II. 受容体の解析法
 1. 受容体の単離精製およびクローニング
 2. マイクロアレイによる受容体解析法
- III. 受容体と臨床
 1. $\alpha 1$ アドレナリン受容体のサブタイプと臨床応用
 2. オーフアン G 蛋白質共役型受容体のリガンド探索と創薬への応用
 3. 酵素リガンド受容体の臨床展望
 4. 核内受容体を介した治療薬の可能性～PPAR γ 受容体を中心に～
 5. グルタミン酸受容体と行動薬理
 6. バゾプレッシン受容体拮抗薬の開発現況
 7. プロスタノイド受容体関連薬物の臨床の現況と今後の展開
 8. レプチン受容体と抗肥満薬
 9. 治療におけるアンジオテンシン II 受容体
 10. セロトニン受容体サブタイプと新規標的の疾病
 11. 循環系疾患とエンドセリン受容体



株式会社 医薬ジャーナル社

〒541-0047 大阪市中央区淡路町3丁目1番5号・淡路町ビル2F 電話:06(6202)7200(代) FAX:06(6202)5295 / 振替番号
 〒101-0061 東京都千代田区三崎町3丁目3番1号・TKビル 電話:03(3265)7661(代) FAX:03(3265)8369 / 03910-1-33353

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

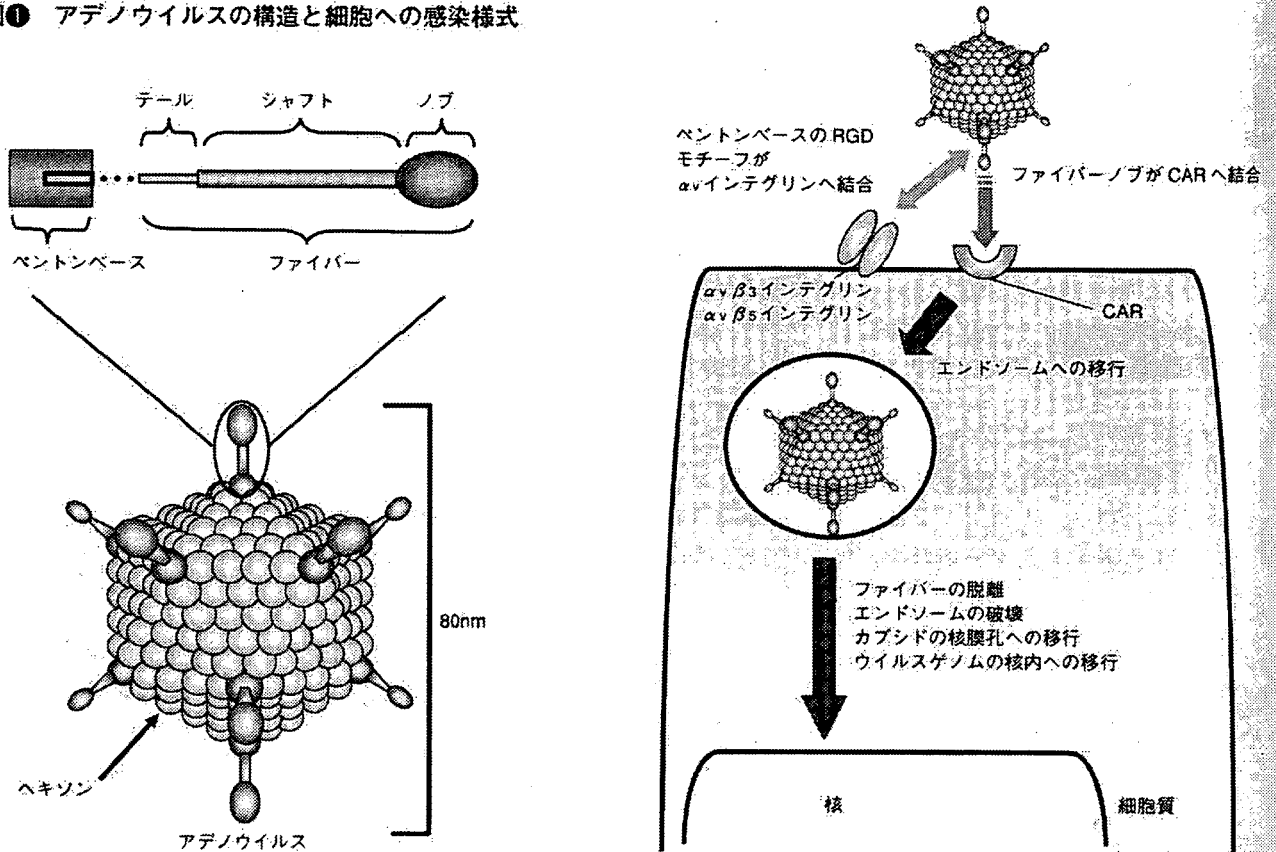
ウイルスベクターの開発研究は、遺伝子治療の進展とともに発展しており、これまでの遺伝子治療臨床研究で用いられてきた第一世代のウイルスベクター (ウイルス表面タンパク質の改変などを伴わないベクター) の限界を克服できる第二世代のウイルスベクターの開発研究が、ウイルス (ベクター) 学や遺伝子工学、ナノサイエンス (多くのウイルスは直径数十~数百 nm のサイズである) の発展とともに活発に行われている。本稿では、直径約 80nm のアデノウイルスの表面タンパク質を遺伝子工学的に改変することで感染域を制御できる改良型アデノウイルスベクターの開発研究について解説する。

1. 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 [カプシド²⁾: 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³⁾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⁴⁾、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。

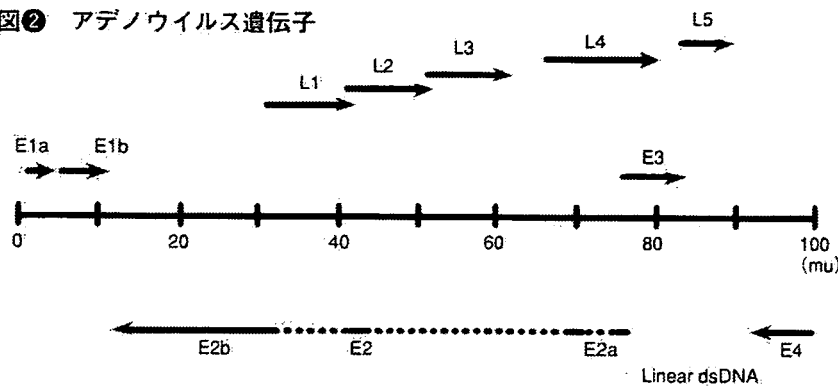
すべてのアデノウイルスのプロモーターが活性化される)を削除し、この領域を外来遺伝子に置き換えることにより増殖不能ウイルスとしている（EI欠損領域以外の領域に外来遺伝子を挿入する場合もある）。アデノウイルスベクターを増幅する場合には、EIタンパク質をトランスに供給できる細胞株である293細胞⁴⁾などを使用する。

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（カチオン性リポソーム・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

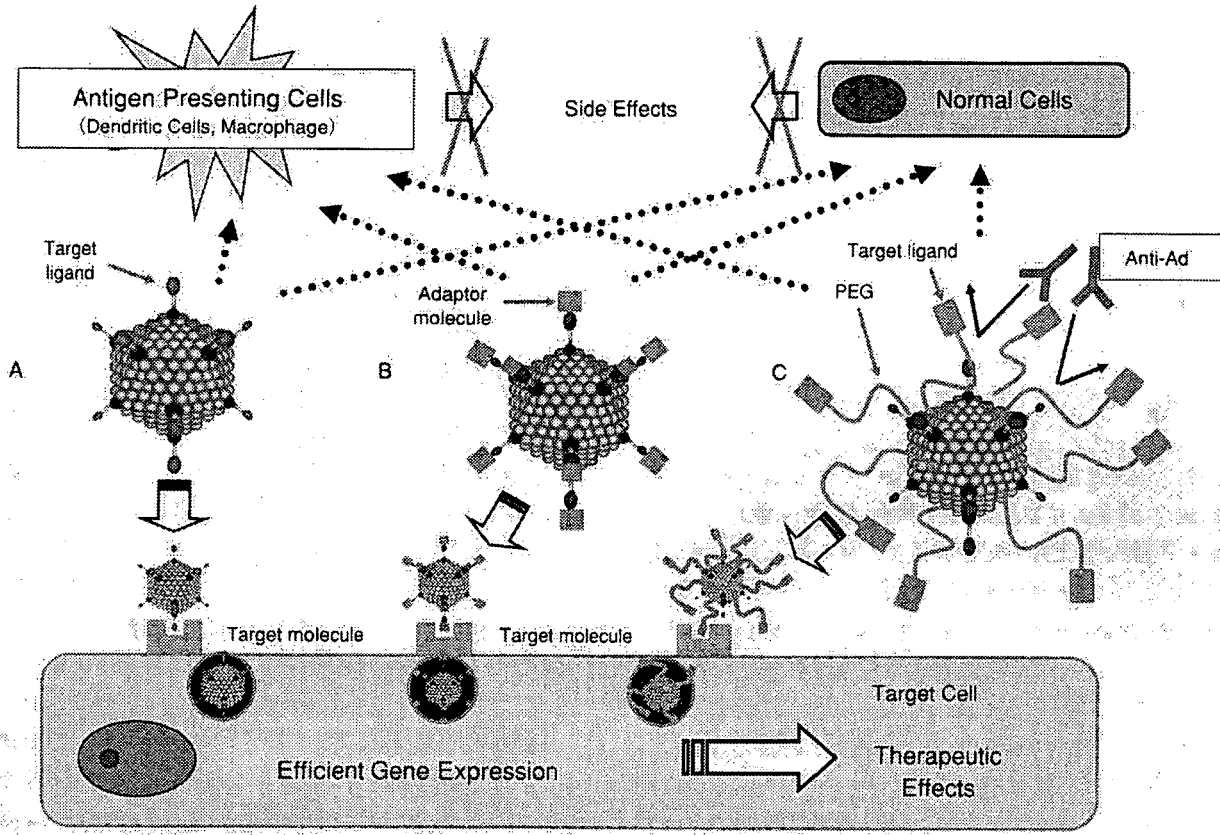
伝子が希釈されることで、一過性の遺伝子発現を示す。一方、分化した増殖停止期の細胞に対しては、アデノウイルスに対する免疫の問題が克服されれば、数ヶ月以上の長期の遺伝子発現を示す³⁾）、③他のウイルスベクターに比べ圧倒的に高いタイター（力価）のベクター（通常、他のベクターに比べ1000倍以上）が得られること、などの長所を有し、ベクターとしての優れた基本的性質を有している。

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



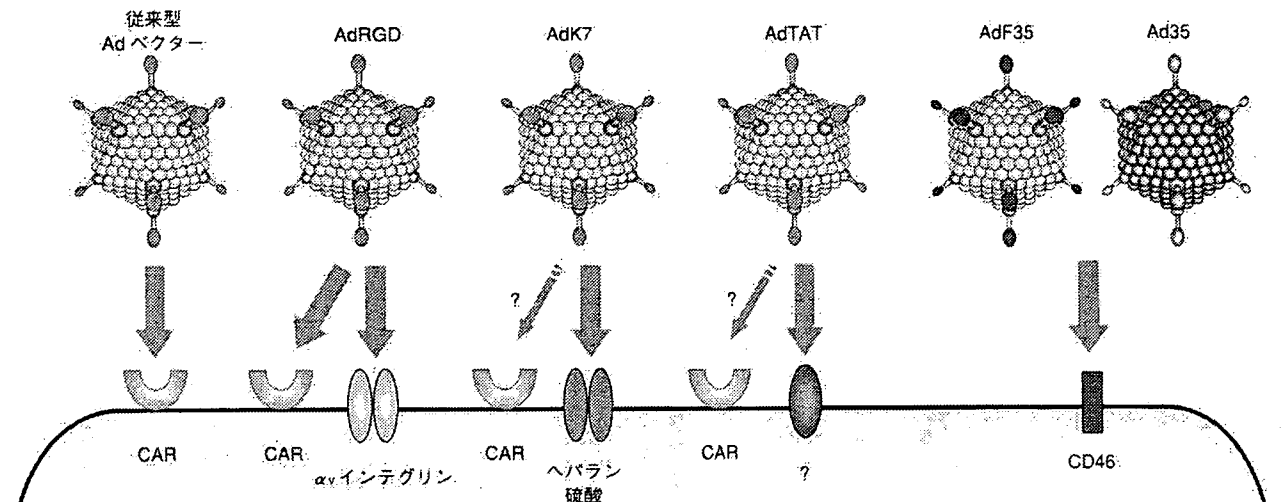
標的細胞指向性を制御でき、組織特異性を有するアデノウイルスベクター開発のための方法論としては主に3つのアプローチに別けられる。
 A. ウイルスカプシドの遺伝子工学的改変 B. アダプター分子の使用による生化学的改変
 C. リガンドを付与した高分子による化学的改変

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)

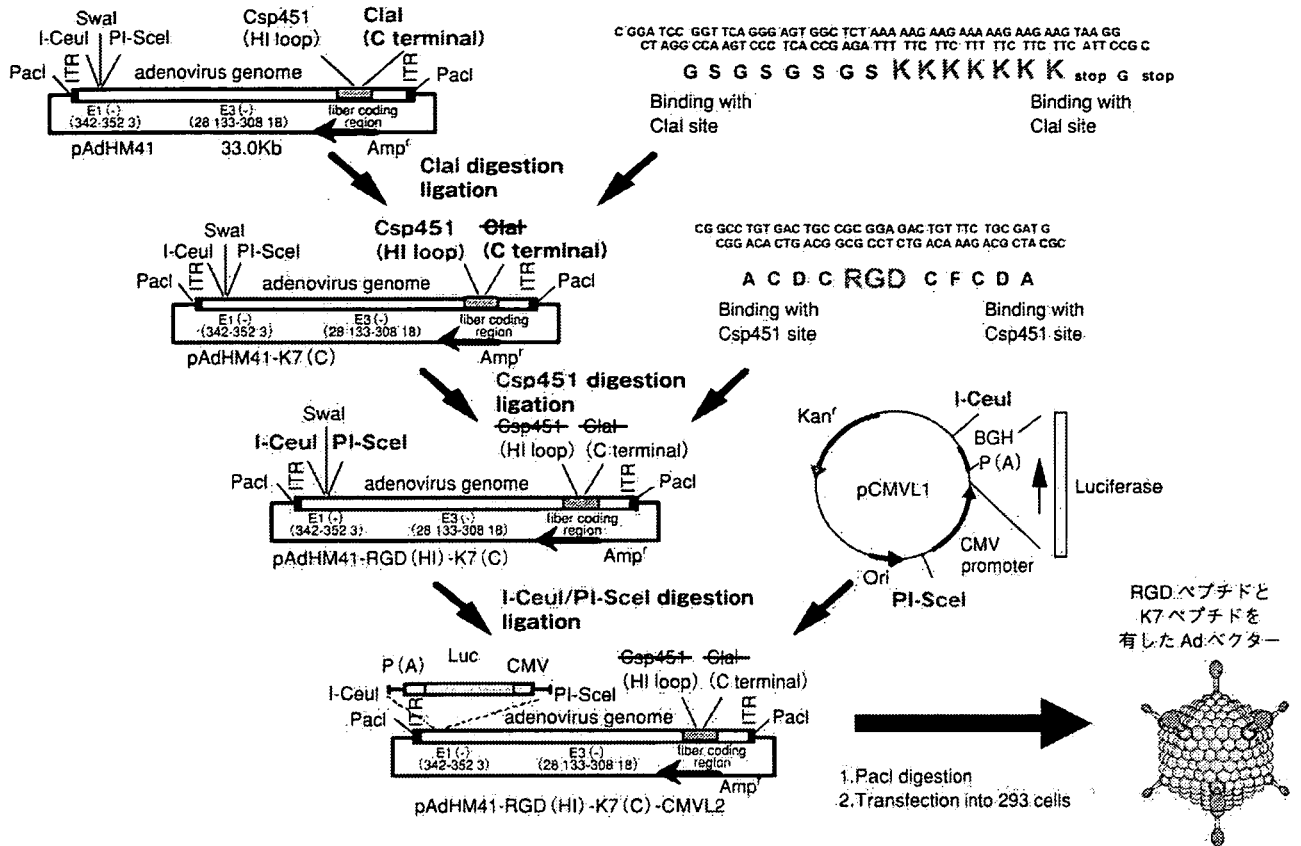
去の総説⁴⁾や共同研究者の倉知らの解説⁵⁾を参照されたい。

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⁾⁻¹²⁾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⁾⁻¹²⁾。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



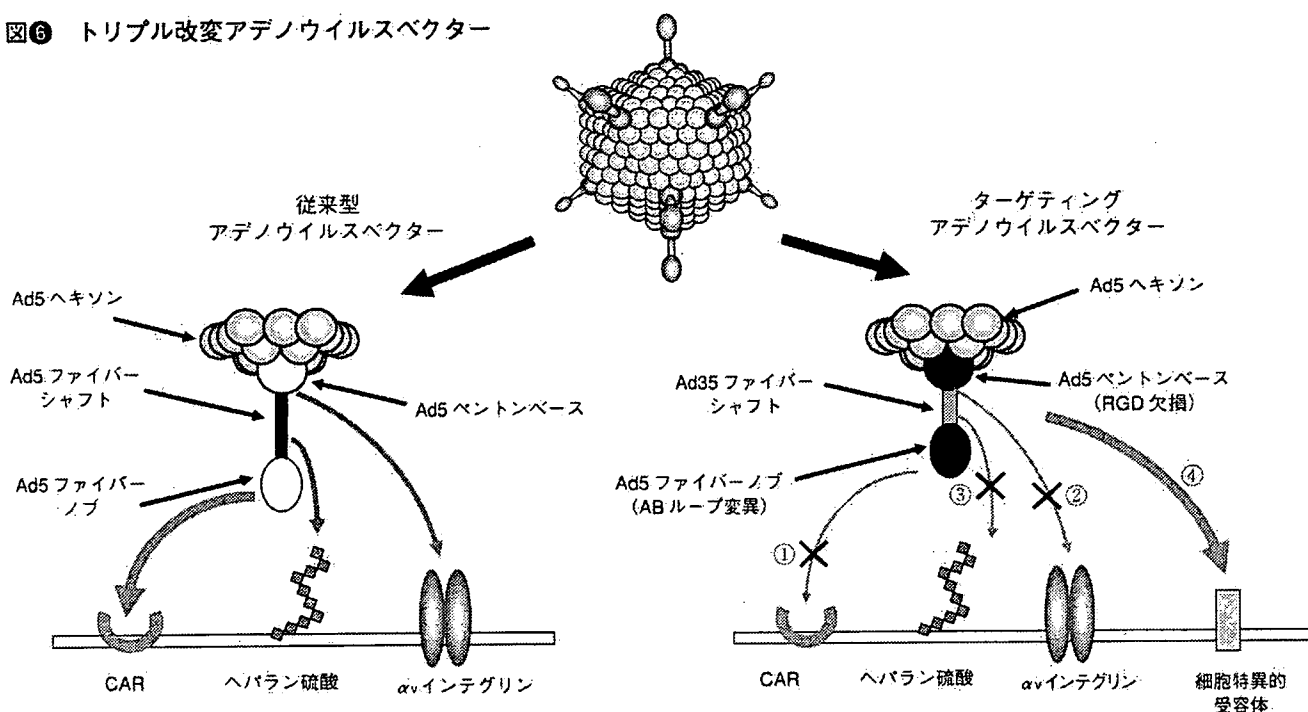
ファイバーノブのHI ループあるいはC末端をコードする遺伝子配列部分にユニークな制限酵素であるCsp45IあるいはClaIの切断部位(それぞれ)をもったベクタープラスミドpAdHM41を両酵素で切断し、挿入したいペプチド(この場合RGD配列およびポリリジン配列)に相当する合成オリゴDNAを*in vitro*ライゲーションで導入する。その後、I-CeuIとPI-SceI部位を利用して*in vitro*ライゲーションでルシフェラーゼ遺伝子をE1欠損部位に挿入する。生じたプラスミドをウイルスゲノム両末端に存在するPaclI部位で切断し、293細胞にトランスフェクションすると、RGD配列とポリリジ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

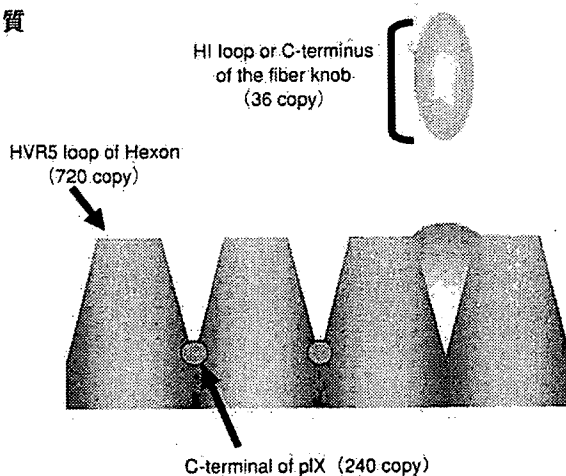
一方、*in vivo*において標的細胞特異的に遺伝子導入可能なターゲティングアデノウイルスベクターの開発も進んでいる。この場合、ネイティブのアデノウイルスがもつ感染能を消失させて、細胞特異的受容体を認識して感染できるように改変を行う必要がある。アデノウイルスは前述のようにファイバーとCARとの結合が感染に重要な役割を果たすが、低親和性であるがペントンベースのRGDモチーフやファイバーシャフトのKKTKモチーフ

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 α_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、ヘキソンとヘキシ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_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、EI 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 F, Mizuguchi H, 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, 中川智作 : 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. Márk A Kázy)
 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。

改良型アデノウイルスベクターを用いた 各種幹細胞への遺伝子デリバリー

特集 遺伝子・核酸医薬品のデリバリー

川端健二・櫻井文教^{*1)}，水口裕之^{*1,2)}

Gene delivery into stem cells by modified adenovirus vectors.

The application of adenovirus (Ad) vectors, which are widely used in gene therapy, depends on CAR (coxsackievirus and adenovirus receptor) expression on the cells. To overcome this problem, the capsid proteins of Ad vectors have been genetically modified. Here, we introduce several types of capsid-modified Ad vectors. Furthermore, we describe the application of capsid-modified Ad vectors into some kinds of stem cells for regenerative medicine.

アデノウイルスベクターは、遺伝子治療や基礎研究に幅広く用いられている。しかしながら、アデノウイルスベクターの受容体であるCARの発現が乏しい細胞では、アデノウイルスベクターによる遺伝子導入効率は低い。そこで筆者らは、CAR非依存的に遺伝子導入可能な種々のカプシド改変型アデノウイルスベクターを開発してきた。本稿では、これらのカプシド改変型アデノウイルスベクターの特徴と、その応用例として、近年、再生医療分野で注目を浴びている各種幹細胞への高効率遺伝子導入法について解説する。

Kenji Kawabata・Fuminori Sakurai^{*1)}・Hiroyuki Mizuguchi^{*1,2)}

key words: adenovirus vector, gene delivery, stem cells, regenerative medicine, gene therapy

ヒトアデノウイルスは、赤血球凝集活性の違いからAからFまでのサブグループにわけられ、計51種の血清型が存在する。遺伝子治療用ベクターとして繁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。5型アデノウイルスの感染は、カプシド蛋白質のファイバーが細胞表面に存在するCAR (coxsackievirus and adenovirus receptor) と結合することにより起こる。そのため、従来の5型アデノウイルスベクターは、CAR陽性細胞へは効率よく遺伝子導入可能であるが、CARの発現が乏しい細胞への遺伝子導入効率はきわめて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、造血幹細胞や間葉系幹細胞などの幹細胞、血液細胞、悪性度の高いがん細胞、血管内皮細胞などがあげられ、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。

本稿では、CAR陰性細胞に対しても高効率遺伝子導入が可能な種々の改良型アデノウイルスベクターについて概説し、つぎにその応用例として、近年、再生医療への応用が期待されている幹細胞への高効率遺伝子導入法について紹介する。

改良型アデノウイルスベクター

1. ファイバー改変型アデノウイルスベクター

アデノウイルスのファイバーはノブ、シャフト、テール領域にわけられ、ノブ領域がCARと結合する(図1a)。アデノウイルスベクターの感染域を拡大するためのアプローチの一つとして、ファイバーノブのHIループやC末端領域に細胞接着活性などを有する外来ペプチドを遺伝子工学的に挿入することがあげられる。

筆者らは、これらの部位に外来ペプチドをコードした遺伝子をきわめて簡便に挿入できるファイバー

^{*1)} 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的研究部遺伝子導入制御プロジェクト

^{*2)} Department of Biopharmaceutics, Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Osaka University 大阪大学大学院薬学研究所

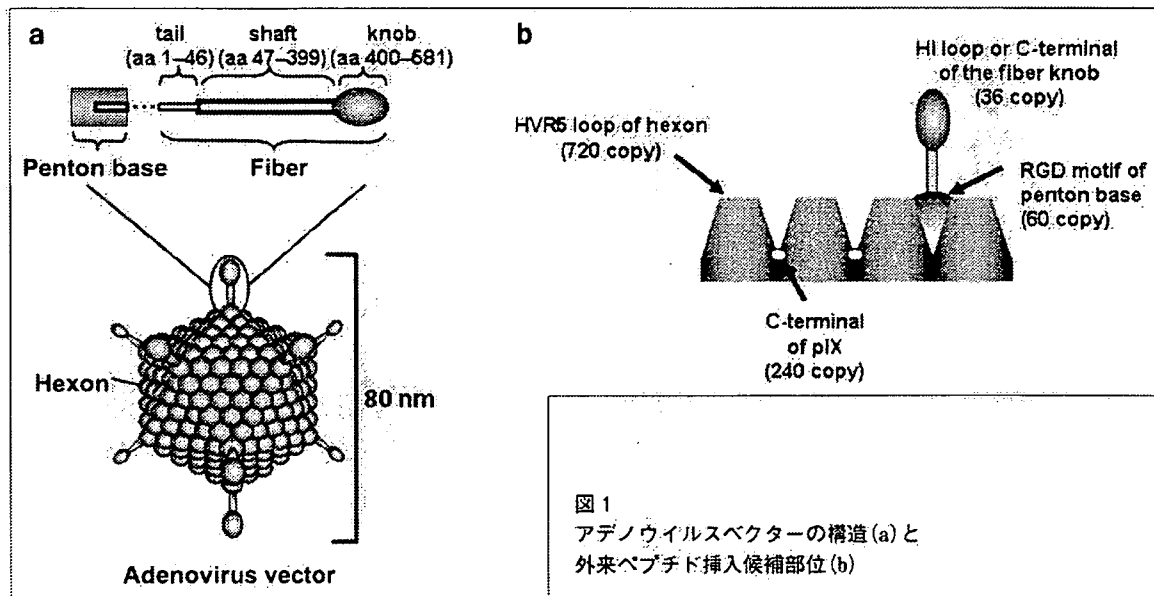


図1
アデノウイルスベクターの構造(a)と
外来ペプチド挿入候補部位(b)

改変型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)}を組み合わせることにより、CAR 陰性細胞に対しても高効率に遺伝子導入が可能なるアデノウイルスベクターを簡便に作製する方法を開発した(図2, 表1)。ファイバーノブの HI ループに RGD(リジン-グリシン-アスパラギン酸)からなるペプチドを挿入しインテグリンと親和性を保持させることにより(RGD 型ベクター)、種々のがん細胞^{5,6)}や樹状細胞⁷⁾、血管内皮細胞⁸⁾に高効率な遺伝子導入が可能となった。また、ファイバーノブの C 末端領域に七つのリジン残基からなるポリペプチドを挿入したファイバー改変型(K7型)アデノウイルスベクターでは、ヘパラン硫酸と親和性を有するようになり、種々の CAR 陰性細胞に効率よく遺伝子導入が可能である^{2,9)}。

さらに筆者らは、最近、HIV(human immunodeficiency virus)由来の protein transduction domain (PTD: 蛋白質導入ドメイン)として知られている Tat ペプチド¹⁰⁾をファイバーノブに付与することで、RGD 配列やポリリジン配列を付与したベクターよりも、より広範に効率よく外来遺伝子を発現可能であることを見いだした。したがって、Tat ペプチドを付与したアデノウイルスベクターは、遺伝子治療用ベクターや基礎研究におけるツールとしてきわ

めて有用であると考えられる。

2. ファイバー置換型アデノウイルスベクター

サブグループ B に属する 11 型あるいは 35 型などのアデノウイルスは CAR ではなく、補体制御因子として知られている CD46 を受容体として感染することが知られている^{11,12)}。

そこで筆者らは、5 型アデノウイルスベクターのファイバー領域のみを 35 型アデノウイルスのものに置換したベクター(F35 型ベクター)やすべての構造蛋白質を 35 型アデノウイルスからなるベクターを開発した(図2)¹³⁻¹⁵⁾。ヒトにおいては、CD46 は赤血球を除くほぼすべての細胞に発現していることが知られており、これらのベクターは、多くのヒト由来細胞だけではなく、たとえば 5 型アデノウイルスベクターでの遺伝子導入が困難で、遺伝子治療の重要な標的細胞である CD34 陽性ヒト造血幹細胞にも効率よく遺伝子導入可能であることが明らかとなった^{14,16)}。

3. ヘキソン、pIX 改変型アデノウイルスベクター

ファイバーは、ウイルス 1 粒子当たり 12 分子存在するが(ファイバーは 3 量体を形成するため、ノブは 36 コピー存在する)、主要なカプシド蛋白質のヘキソンは 240 分子(同じく 3 量体をとっている

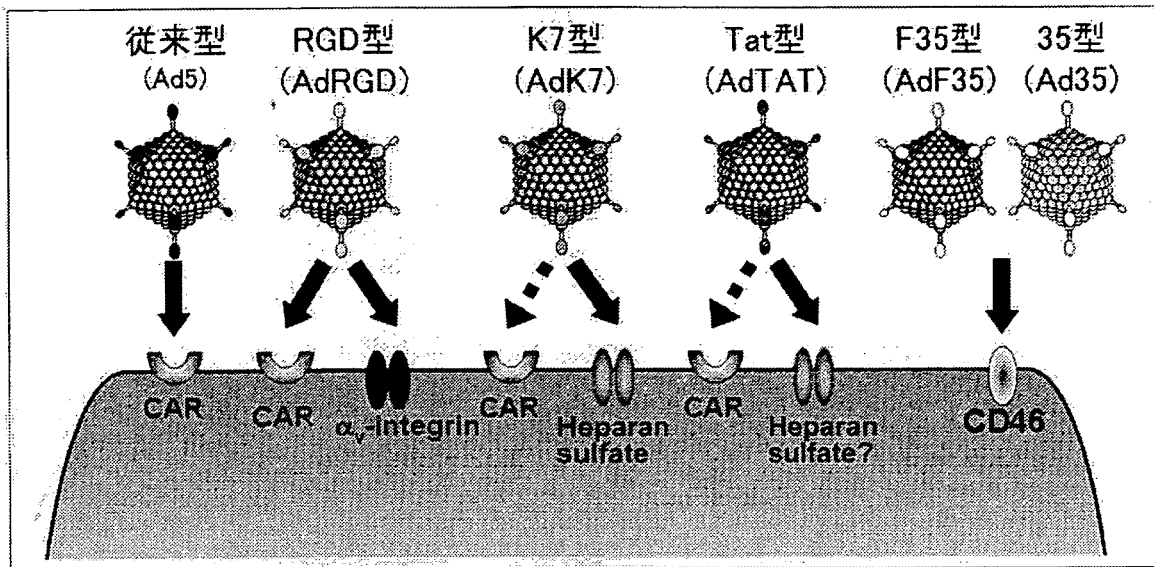


図2 筆者らが独自に開発した改良型アデノウイルスベクター

野生型のファイバーを持った従来の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型ベクターは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。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、すべての構造蛋白質が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。Tat型ベクターは未知の機構により(ヘパラン硫酸を介するという報告もある)細胞内に取り込まれる。

表1 改良型アデノウイルスベクターを用いた各種細胞への遺伝子導入効率

	従来型 Ad	改良型 Ad
ヒト造血幹細胞 (CD34 陽性細胞)	5%以下	50%以上 (Ad35)
ヒト間葉系幹細胞	10%以下	100% (AdK7)
マウス ES 細胞	10%以下	90%以上 (Ad5-EF1 α -プロモーター)
樹状細胞 (ヒト・マウス)	10%以下	90%以上 (AdRGD)
CAR 陰性がん細胞 (ヒト・マウス)	10%以下	100% (AdRGD)
マウス脂肪細胞	10%以下	50%以上 (AdK7)

ため、720コピー存在する)、pIX(プロテインIX)は240分子(240コピー)存在するため、これらの領域を改変できれば、より効率のよい遺伝子導入が可能になることが期待される(図1b)。ヘキソンは、ウイルス粒子の中で最も豊富に存在する蛋白質であり、カプシドの構造を維持する役割を有する。またpIXは、ヘキソンカプソマーの間に挟まれた形で存在し、ヘキソン同士の結合を補助する。

そこで、ヘキシソンのhypervariable region 5 (HPV5)およびpIXのC末端に外来ペプチドを挿

入できるベクター系を構築し、ファイバー改変型、ヘキソン改変型、pIX改変型各アデノウイルスベクターの遺伝子発現効率について比較検討した¹⁷⁾。

各挿入部位にRGDペプチドを挿入した結果、ファイバーノブのHIループにRGDペプチドを挿入したファイバー改変型アデノウイルスベクターが最も高い遺伝子発現効率を示した。これは、ヘキソンやpIXと比較し、ファイバーノブは最も外側に位置するので、宿主細胞と結合しやすくなっていること、およびヘキソンやpIXに発現させたペプチドはファイバーによる立体障害のため、細胞表面に作用しにくくなっている可能性が原因として考えられる。

したがって、ヘキソンやpIXを改変する場合、ファイバーを遺伝子工学的に欠損させた(ファイバーレス)アデノウイルスベクターを基盤ベクターとすることにより遺伝子発現効率が改善する可能性が考えられ(この場合、同時にCAR経路による遺伝子導入も起こらないため、ターゲティングアデノウイルスベクターの開発にもつながる)、現在検討中である。

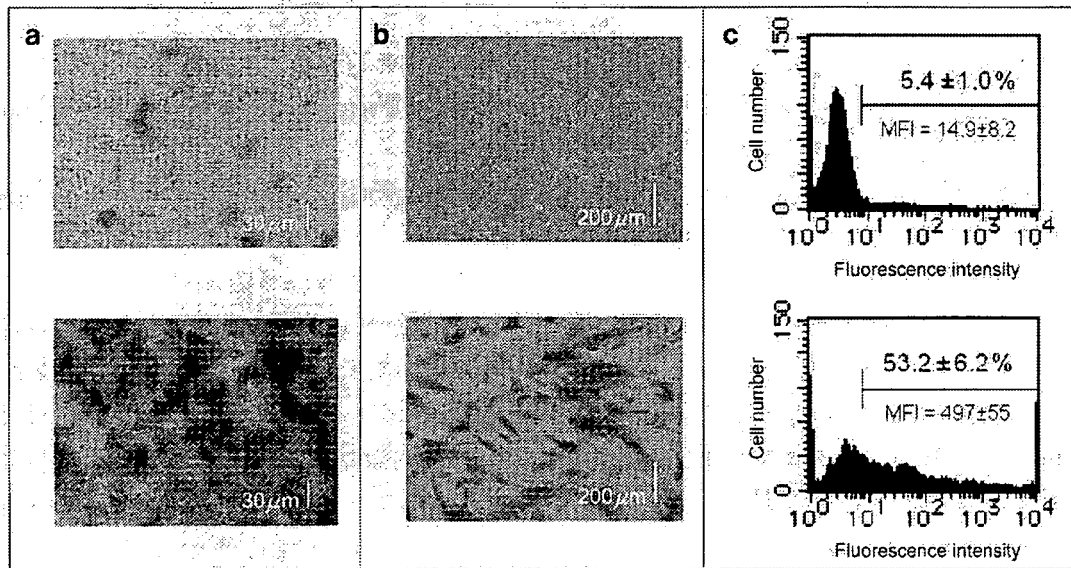


図3 改良型アデノウイルスベクターによる各種幹細胞への高効率遺伝子導入
 a: マウス ES 細胞に対し, CMV プロモーター(上段)あるいは EF-1 α プロモーター(下段)有する β -ガラクトシダーゼ遺伝子を発現する従来型アデノウイルスベクターを感染させた。
 b: ヒト間葉系幹細胞に対し, 従来型(上段)あるいは K7 型(下段)アデノウイルスベクターを用いて β -ガラクトシダーゼ遺伝子を発現させた。
 c: ヒト造血幹細胞に対し, 従来型(上段)あるいは 35 型(下段)アデノウイルスベクターを用いて GFP 遺伝子を発現させた。

ES 細胞への高効率遺伝子導入法

ES 細胞は胚盤胞内部細胞塊由来の細胞であり, 無限に増殖するとともにすべての機能細胞に分化する性質を有する。近年, ヒト ES 細胞が樹立されたことにより, これを再生医療へ応用するための基礎研究が活発に行われている¹⁸⁾。しかしながら, ES 細胞の分化を自由に制御する技術はいまだ確立されておらず, その原因の一つとして ES 細胞への効率よい遺伝子導入法が確立されていないことがあげられる。

これまで, ES 細胞に対しては, プラスミド DNA を用いた電圧ポレーション法(プラスミド DNA を電氣的刺激により細胞内に導入し, 染色体にわずかに目的遺伝子と薬剤耐性遺伝子が組み込まれた細胞を薬剤で選択する方法)¹⁹⁾, レトロウイルスベクター²⁰⁾, レンチウイルスベクター²¹⁾, ポリオーマウイルスの複製機構を利用したスーパーtransフェクション法(ポリオーマウイルスの複製起点を含んだプラスミド DNA がマウス ES 細胞では

エピゾーマルに増幅できる性質を利用した方法)²²⁾などが外来遺伝子導入法として用いられてきた。

しかしながら, これらは半永久的に導入遺伝子を発現しつづける方法であり, ES 細胞の分化制御, 特に医療目的などの細胞分化後には発現を停止させたい場合には好ましくない。アデノウイルスベクターは, 導入遺伝子が宿主染色体へ組み込まれることなく, 染色体外にエピゾームとして存在することから(増幅しない), 遺伝子発現が一過性であり, ES 細胞を目的の機能細胞に分化させたあとは導入遺伝子の発現が消失するものと期待される。

そこで, 筆者らは, マウス ES 細胞に最も適したアデノウイルスベクターによる遺伝子導入法の確立を試みた。その結果, マウス ES 細胞はアデノウイルス受容体 CAR を高発現しており, 従来型アデノウイルスベクターが最適であることが明らかとなった²³⁾。また, RSV, CMV, CA(β -actin promoter/CMV enhancer), EF-1 α の 4 種のプロモーターを用いて検討した結果, ES 細胞には CA および EF-1 α プロモーターを用いた場合にのみ遺

伝子発現がみられ、RSVやCMVプロモーターはほとんど機能しなかった(図3a)。

これまでアデノウイルスベクターは、ES細胞への遺伝子導入には不適と考えられてきたが、これは多くの場合、最も一般的に用いられているCMVプロモーターを用いて検討されてきたためであり、ウイルスの細胞へのエンタリー自体には問題がないことが示された。ただし、CAプロモーターを用いた場合には、ES細胞のみならずその支持細胞(フィーダー細胞)である胚線維芽細胞にも遺伝子発現がみられたのに対し、EF-1 α プロモーターを用いた場合には、ほぼES細胞特異的に遺伝子発現可能であった。これは、EF-1 α プロモーターの活性が胚線維芽細胞に比べES細胞において相対的に高いことが原因と考えられる。したがって、目的により両プロモーターを使いわけることによって、再生医療への幅広い応用が期待できる。

つぎに、最適化されたアデノウイルスベクターを用いてES細胞に機能遺伝子を導入し、実際にES細胞の分化を制御できるかどうかについて検討した。マウスES細胞は、フィーダー細胞由来のサイトカインLIF(leukemia inhibitory factor)がその未分化維持に必須であることが知られている。LIFは受容体に結合後、下流のSTAT3(signal transducer and activator of transcription 3)を介してシグナルを伝達する。

そこで、EF-1 α プロモーターを有した従来型アデノウイルスベクターを用いて、STAT3のdominant-negative変異体(STAT3F)のcDNAをマウスES細胞に導入することにより、LIFの下流シグナルを阻害させたところ、LIF存在下でもES細胞は三胚葉すべての細胞に分化することが明らかとなった。ES細胞の未分化維持には、LIF以外にもNanogなどの転写因子が必須であることが明らかとなっている。

そこで、先述のベクターを用いてSTAT3FとNanogを同時に発現させたところ、STAT3Fによる細胞分化シグナルがNanog発現により阻害され、ES細胞は未分化状態を維持しつづけた。したがって、アデノウイルスベクターを用いることでES細胞の分化を自由に制御できる可能性が示され

た²³⁾。現在、筆者らはES細胞に対し分化に関与するマスター遺伝子などを導入することにより、特定の細胞への分化制御が可能かどうか検討中である。

間葉系幹細胞への高効率遺伝子導入法

間葉系幹細胞は骨髄由来のストローマ細胞であり、骨、軟骨、脂肪、心筋系列などの中胚葉系細胞に分化することができ、未分化状態で細胞を容易に増殖させることが出来る²⁴⁾。また、最近では、間葉系幹細胞は神経細胞、肝細胞、インスリン産生細胞などの外胚葉や内胚葉系の細胞へも分化するという報告もあり、再生医療や組織工学への応用が強く期待されている。

間葉系幹細胞の分化を制御する手段の一つとして、細胞分化に関与する遺伝子を導入することがあげられる。アデノウイルスベクターを用いた間葉系幹細胞への遺伝子導入も試みられてきたが、ヒト間葉系幹細胞はCARを発現していないためにその導入効率はきわめて低く、遺伝子導入には高タイトルのベクターを必要としていた^{25,26)}。

筆者らは、種々のファイバー改変型アデノウイルスベクターを用いて間葉系幹細胞にレポーター遺伝子を導入し、その発現効率を比較検討した。その結果、ヒト間葉系幹細胞にはK7型ベクターが最も適しており、従来型ベクターの460倍の遺伝子導入効率を示すことが明らかとなった(図3b)²⁷⁾。RGD型ベクターやF35型ベクターは、従来型ベクターに比較しそれぞれ16倍、130倍の導入効率を示した。また、種々のプロモーターを用いて比較検討したところ、CAプロモーターが最適であった。

したがって、間葉系幹細胞にはCAプロモーターを有するK7型アデノウイルスベクターを用いることにより、最も高効率に遺伝子導入できることが明らかとなった。間葉系幹細胞は、さまざまな系列の細胞に分化するというだけではなく、担がんマウスに投与された場合には腫瘍に集積する性質を有している²⁸⁾。したがって、間葉系幹細胞は分化させた細胞自身を治療に利用するだけでなく、抗腫瘍性サイトカインなどを発現する間葉系幹細胞を、がんに対する細胞治療薬として利用できる可能性があり、現

在検討している。

造血幹細胞への高効率遺伝子導入法

造血幹細胞は成体では主に骨髄に存在し、すべての血液細胞に分化する能力を有する。造血幹細胞に対する遺伝子導入は、主にレトロウイルスベクターやレンチウイルスベクターが用いられてきたが、これらのベクターは半永久的に導入遺伝子を発現しつづけるため、治療目的に応用するには不都合が生じる場合がある。たとえば、MDR1(multi-drug resistance gene 1)遺伝子をレンチウイルスベクターを用いて造血幹細胞に導入した場合、導入遺伝子が細胞分化後も発現するため、生体(マウス)に移植した場合に白血病を発症するという報告がある²⁹⁾。また、重症複合性免疫不全症候群(X-SCID)の患者に対して行われたレトロウイルスベクターによる遺伝子治療では、ウイルスゲノムの染色体へのランダムな組込みにより白血病を発症するという副作用が起きた(がん遺伝子である LMO2 遺伝子の近傍に治療用遺伝子が挿入されたことが直接の原因である)³⁰⁾。したがって、再生医療への応用には、アデノウイルスベクターのように発現が一過性のベクターが好ましいことが多い。

しかしながら、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%と低い。一方、ほぼすべての CD34 陽性細胞は CD46 を発現しているため、35型アデノウイルスベクターを用いて遺伝子導入を行ったところ、50%以上の遺伝子導入効率を得られることが明らかとなった(図 3c)¹⁴⁾。また、CD34 陽性細胞への遺伝子導入に適したプロモーターを探索した結果、EF-1 α 、CA、CMVi(イントロン A を付加した CMV プロモーター)などのプロモーターを用いることにより高い遺伝子発現が得られた¹⁶⁾。

したがって、最適化されたアデノウイルスベクターを用いて HoxB4 などの造血幹細胞の増殖に関する遺伝子を導入することにより、これまで困難とされてきた造血幹細胞の *in vitro* での増幅が可能ではないかと考え、現在検討中である。また、*in*

vivo においては細胞増殖や抗アポトーシス、ホーミングに参与する遺伝子を造血幹細胞に導入することにより、造血幹細胞を *in vivo* へ移植後の骨髄への生着細胞数が上昇する結果、移植効率の向上が得られる可能性が考えられ、これに関しても現在研究を進めている。

以上、各種幹細胞を用いた再生医療への応用において障害となっている遺伝子導入に関し、改良型アデノウイルスベクターの有用性について解説した。また表1には、これら幹細胞を含むさまざまな細胞種への改良型アデノウイルスベクターでの遺伝子導入効率の改善例について示した。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 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.
- 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) Kasono K, Blackwell JL, Douglas JT, Dmitriev I, Strong TV et al.: Selective gene delivery to head and neck cancer cells via an integrin targeted adenoviral vector. *Clin Cancer Res* 5: 2571-2579, 1999.
- 6) Vanderkwaak TJ, Wang M, Gomez-Navarro J, Rancourt C, Dmitriev V et al.: An advanced generation of adenoviral vectors selectively enhances gene transfer for ovarian cancer gene therapy approaches. *Gynecol Oncol* 74: 227-234, 1999.
- 7) Okada N, Saito T, Masunaga Y, Tsukada Y, Nakagawa S et al.: Efficient antigen gene transduction using Arg-Gly-Asp fiber-mutant adenovirus vectors can potentiate antitumor vaccine efficacy and maturation of murine dendritic cells. *Cancer Res* 61: 7913-7919, 2001.
- 8) Biermann V, Volpers C, Hussmann S, Stock A, Kewes H et al.: Targeting of high-capacity adenoviral vectors. *Hum Gene Ther* 12: 1757-1769, 2001.
- 9) Wickham TJ, Tzeng E, Shears LL, Roelvink PW, Li Y, et al.: Increased *in vitro* and *in vivo* gene transfer by adenovirus vectors containing chimeric fiber proteins. *J Virol* 71: 8221-8229, 1997.
- 10) Gupta B, Levchenko TS, Torchilin VP: Intracellular delivery of large molecules and small particles by cell-penetrating proteins and peptides. *Adv Drug Deliv Rev* 57: 637-651, 2005.

- 11) Gaggar A, Shayakhmetov DM, Lieber A : CD46 is a cellular receptor for group B adenoviruses. *Nat Med* 9 : 1408-1412, 2003.
- 12) Segerman A, Atkinson JP, Marttila M, Dennerquist V, Wadell G et al. : Adenovirus type 11 uses CD46 as a cellular receptor. *J Virol* 77 : 9183-9191, 2003.
- 13) 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.
- 14) Sakurai F, Mizuguchi H, Hayakawa T : Efficient gene transfer into CD34+ cells by an adenovirus serotype 35 vector. *Gene Ther* 10 : 1041-1048, 2003.
- 15) 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.
- 16) Sakurai F, Kawabata K, Yamaguchi T, Hayakawa T, Mizuguchi H : Optimization of adenovirus serotype 35 vectors for efficient transduction in human hematopoietic progenitors : Comparison of promoter activities. *Gene Ther* 12 : 1424-1433, 2005.
- 17) Kurachi S, Koizumi N, Sakurai F, Kawabata K, Sakurai H et al. : Characterization of capsid-modified adenovirus vectors containing heterologous peptides in the fiber knob, protein IX, or hexon. *Gene Ther*. (in press).
- 18) Kawabata K, Sakurai F, Koizumi N, Hayakawa T, Mizuguchi H : Adenovirus vector-mediated gene transfer into stem cells. *Mol Pharm* 3 : 95-103, 2006.
- 19) Tompers DM, Labosky PA : Electroporation of murine embryonic stem cells : a step-by-step guide. *Stem Cells* 22 : 243-249, 2004.
- 20) Cherry SR, Biniszkievicz D, van Parijs L, Baltimore D, Jaenisch R : Retroviral expression in embryonic stem cells and hematopoietic stem cells. *Mol Cell Biol* 20 : 7419-7426, 2000.
- 21) Gropp M, Itsykson P, Singer O, Ben-Hur T, Reinhartz E et al. : Stable genetic modification of human embryonic stem cells by lentiviral vectors. *Mol Ther* 7 : 281-287, 2003.
- 22) Niwa H, Masui S, Chambers I, Smith AG, Miyazaki J : Phenotypic complementation establishes requirements for specific POU domain and generic transactivation function of Oct-3/4 in embryonic stem cells. *Mol Cell Biol* 22 : 1526-1536, 2002.
- 23) Kawabata K, Sakurai F, Yamaguchi T, Hayakawa T, Mizuguchi H : Efficient gene transfer into mouse embryonic stem cells with adenovirus vectors. *Mol Ther* 12 : 547-554, 2005.
- 24) Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R et al. : Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* 284 : 143-147, 1999.
- 25) Conget PA, Minguell JJ : Adenoviral-mediated gene transfer into *ex vivo* expanded human bone marrow mesenchymal progenitor cells. *Exp Hematol* 28 : 382-390, 2000.
- 26) Hung SC, Lu CY, Shyue SK, Liu HC, Ho LL : Lineage differentiation-associated loss of adenoviral susceptibility and Coxsackie-adenovirus receptor expression in human mesenchymal stem cells. *Stem Cells* 22 : 1321-1329, 2004.
- 27) Mizuguchi H, Sasaki T, Kawabata K, Sakurai F, Hayakawa T : Fiber-modified adenovirus vectors mediate efficient gene transfer into undifferentiated and adipogenic-differentiated human mesenchymal stem cells. *Biochem Biophys Res Commun* 332 : 1101-1106, 2005.
- 28) Studeny M, Marini FC, Dembinski JL, Zompetta C, Cabreira-Hansen M et al. : Mesenchymal stem cells : potential precursors for tumor stroma and targeted-delivery vehicles for anticancer agents. *J Natl Cancer Inst* 96 : 1593-1603, 2004.
- 29) Bunting KD, Galipeau J, Topham D, Benaim E, Sorrentino BP : Transduction of murine bone marrow cells with an MDR1 vector enables *ex vivo* stem cell expansion, but these expanded grafts cause a myeloproliferative syndrome in transplanted mice. *Blood* 92 : 2269-2279, 1998.
- 30) Hacein-Bey-Abina S, Von Kalle C, Schmidt M, McCormack MP, Wulffraat N et al. : LMO2-associated clonal T cell proliferation in two patients after gene therapy for SCID-X1. *Science* 302 : 415-419, 2003.

"DDS" 用語解説 No. 112

ウイルスベクター (virus vector)

ウイルスベクターとは、ウイルス本来が持つ感染機構を利用して外来遺伝子を細胞に導入・発現させる遺伝子導入用ベクターである。ウイルスベクターでは、そのウイルスゲノムから自己複製に必須の遺伝子を取り除くことで自己複製不能となっており、外来遺伝子がウイルスゲノムに挿入されている。これまでにレトロウイルスベクター、アデノウイルス(Ad)ベクターをはじめ、多くのウイルスベクターが開発されており、2006年6月までの遺伝子治療臨床試験のうち、約70%でウイルスベクターが用いられている。これらウイルスベクターは、基本骨格となるウイルスの種類によりその遺伝子導入特性は大きく異なるが、プラスミドDNAを基本とした非ウイルスベクターと比較して、総じて遺伝子導入効率にすぐれる一方、ウイルスベクターの抗原性や感染域、作製方法の煩雑さ、ウイルスに対する抗体保持率などが問題となっている。

近年、これらの問題点を克服した次世代ウイルスベクターの開発研究が盛んに行われている。たとえば、subgroup Cに属する従来のAdベクターはAd受容体(CAR)を発現していない細胞(樹状細胞や血液細胞など)への遺伝子導入効率はきわめて低い。しかし、subgroup Bに属するAdベクター(35型Adベクターなど)はCD46を受容体として認識するため(ヒトCD46は赤血球を除くほぼすべての細胞に発現している)、ヒト造血幹細胞をはじめとする広範な細胞種に対し高効率な遺伝子導入が可能である。

櫻井文教 (Fuminori Sakurai)
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