

- [177] S. Roy, P.S. Shirley, A. McClelland, M. Kaleko, Circumvention of immunity to the adenovirus major coat protein hexon, *J. Virol.* 72 (1998) 6875–6879.
- [178] N. Morral, W. O'Neal, K. Rice, M. Leland, J. Kaplan, P.A. Piedra, H. Zhou, R.J. Parks, R. Velji, E. Aguilar-Cordova, S. Wadsworth, F.L. Graham, S. Kochanek, K.D. Carey, A.L. Beaudet, Administration of helper-dependent adenoviral vectors and sequential delivery of different vector serotype for long-term liver-directed gene transfer in baboons, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 96 (1999) 12816–12821.
- [179] W. Gao, P.D. Robbins, A. Gambotto, Human adenovirus type 35: nucleotide sequence and vector development, *Gene Ther.* 10 (2003) 1941–1949.
- [180] P. Seshidhar Reddy, S. Ganesh, M.P. Limbach, T. Brann, A. Pinkstaff, M. Kaloss, M. Kaleko, S. Connelly, Development of adenovirus serotype 35 as a gene transfer vector, *Virology* 311 (2003) 384–393.
- [181] R. Vogels, D. Zuijdgheest, R. van Rijnsoever, E. Hartkoorn, I. Damen, M.P. de Bethune, S. Kostense, G. Penders, N. Helmus, W. Koudstaal, M. Cecchini, A. Wetterwald, M. Sprangers, A. Lemckert, O. Ophorst, B. Koel, M. van Meerendonk, P. Quax, L. Panitti, J. Grimbergen, A. Bout, J. Goudsmit, M. Havenga, Replication-deficient human adenovirus type 35 vectors for gene transfer and vaccination: efficient human cell infection and bypass of preexisting adenovirus immunity, *J. Virol.* 77 (2003) 8263–8271.
- [182] F. Sakurai, H. Mizuguchi, T. Hayakawa, Efficient gene transfer into human CD34+ cells by an adenovirus type 35 vector, *Gene Ther.* 10 (2003) 1041–1048.
- [183] T. Nguyen, J. Nery, S. Joseph, C. Rocha, G. Carney, K. Spindler, L. Villarreal, Mouse adenovirus (MAV-1) expression in primary human endothelial cells and generation of a full-length infectious plasmid, *Gene Ther.* 6 (1999) 1291–1297.
- [184] A. Francois, N. Etteradossi, B. Delmas, V. Payet, P. Langlois, Construction of avian adenovirus CELO recombinants in cosmids, *J. Virol.* 75 (2001) 5288–5301.
- [185] P.S. Reddy, N. Idamakanti, Y. Chen, T. Whale, L.A. Babiuk, M. Mehtali, S.K. Tikoo, Replication-defective bovine adenovirus type 3 as an expression vector, *J. Virol.* 73 (1999) 9137–9144.
- [186] E.J. Kremer, S. Boutin, M. Chillon, O. Danos, Canine adenovirus vectors: an alternative for adenovirus-mediated gene transfer, *J. Virol.* 74 (2000) 505–512.
- [187] S. Moffatt, J. Hays, H. HogenEsch, S.K. Mittal, Circumvention of vector-specific neutralizing antibody response by alternating use of human and non-human adenoviruses: implications in gene therapy, *Virology* 272 (2000) 159–167.
- [188] S.F. Farina, G.-P. Gao, Z.Q. Xiang, J.J. Rux, R.M. Burnett, M.R. Alvira, J. Marsh, H.C. Ertl, J.M. Wilson, Replication-defective vector based on a chimpanzee adenovirus, *J. Virol.* 75 (2001) 11603–11613.

新薬展望 2008

第1部 医薬品開発研究の最前線

第1部

遺伝子治療研究の動向

水口 裕之*

本総説では、これまで施行されてきた遺伝子治療臨床研究と現在の国内外の研究動向、および遺伝子治療を支える基盤技術開発の現状について解説する。

■キーワード：遺伝子治療、ベクター

1 はじめに

1991年に米国において、世界で最初の遺伝子治療臨床研究がアデノシンデアミナーゼ (ADA) 欠損症に対して行われてから17年が経過した。その後、遺伝子治療は先天性の遺伝性疾患だけでなく、エイズなどの感染症や痛をはじめとした後天性疾患、末梢性血管疾患をはじめとする生活習慣病に対しても広く行われ、痛で871、血管疾患で119、先天性遺伝性疾患で109、感染症で85の合計1,300以上（他の疾患に対するものを含む）のプロトコールで遺伝子治療が実施されている。（2007年7月現在）。（<http://www.wiley.co.uk/genmed/clinical/>）。わが国では、現在までに16のプロトコールでの遺伝子治療臨床研究が実施されている。これらの遺伝子治療臨床研究（試験）は第I・II相試験が、合わせて全体の81%を占めており、第III相試験は全体の2.4%にすぎない。本総説では、国内外における遺伝子治療臨床研究の動向と、遺伝子治療を成功に導くために必要な基盤技術開発の現状について解説する。

2 遺伝子治療の成功例

遺伝子治療臨床研究における代表的な成功例と

しては、ADA欠損症と重症複合免疫不全症 (X-SCID) があげられる。ADAはデオキシアデノシンあるいはアデノシンを、イノシンもしくはデオキシイノシンに変換するための触媒酵素であり、本酵素の欠損によりアデノシン、デオキシアデノシンが蓄積すると、DNA複製・修復機構に傷害が生じ、リンパ球減少を特徴とする複合免疫不全症となる。1990年代に行われたADA欠損症に対する遺伝子治療では、末梢血中のリンパ球にADAをつくる正常な遺伝子をレトロウイルスベクターを用いて導入した後、患者に戻す治療が行われ、酵素補充療法 (PEG-ADA: ポリエチレングリコール (PEG) 修飾されたADA酵素の投与) との併用として施行された。わが国においては北海道大学で同様の治療が行われ、治療を受けた患者は日常生活を送られる程の回復がみられている。その後、末梢血中のリンパ球にADA遺伝子を導入するプロトコールでは、細胞寿命の関係で定期的な遺伝子治療を受ける必要があることから、造血幹細胞 (CD34陽性細胞) にADA遺伝子を導入するプロトコールが世界的に行われた。特筆すべきは、北海道大学で行われた造血幹細胞を標的としたADA遺伝子治療では、世界で初めてPEG-ADAを併用せずに免疫機能の回復が認められたことで

*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 プロジェクトリーダー (みずぐち・ひろゆき)

あり、現在患者は有害事象もなく普通に学校に通っている。

X-SCID はインターロイキン受容体の一部として共用されている γc 鎖の変異によって発症する先天性の免疫不全症であり、重症感染症により幼児期までに死亡する致死的疾患である。フランスで行われた X-SCID に対する遺伝子治療では、CD34 陽性細胞に γc 鎖遺伝子をレトロウイルスベクターを用いて導入し、10 例中 9 例で著効 (1 例は感染にて不生育) を示し、治療 2~3 カ月後には多種抗原に対する T 細胞免疫機能が回復した。(B, NK 細胞も部分回復)^{11,12)}。生存することが困難な遺伝病から劇的な回復を見せた治療法であり、世界的に大きな注目を集めたが、後述するように治療 2~3 年後に計 3 例の患者で白血病が発症するという有害事象が起こり (2007 年になってから、4 例目の白血病発症が報告されている)、先端医療研究全体に対して極めて強い衝撃を与えた。

その他、慢性肉芽腫症 (活性酸素生産酵素である NADPH oxidase とよばれる酵素複合体を形成する分子の欠損により、好中球が細菌やカビを殺傷する活性酸素を作ることができず、重篤な微生物感染を繰り返す遺伝性疾患) に対する遺伝子治療においても症状の改善が認められている¹³⁾。

3 遺伝子治療における有害事象

先端医療である遺伝子治療を推進していく上では、安全面には特段の注意が必要である。しかしながらこれまでに、遺伝子治療における有害事象の代表的なものとして、アデノウイルスベクター投与に伴う死亡事故と、レトロウイルスベクターによる染色体への治療用遺伝子の挿入に伴う白血病の発症が報告されている。

1999 年、米国ペンシルバニア大学でオルニチントランスカルバミラーゼ (OTC) 欠損症 (OTC 遺伝子の異常により、肝臓でアンモニアを分解できない遺伝病) の遺伝子治療臨床研究の経過中、大量のアデノウイルスベクターの全身投与によって、一人の男性患者が 4 日後に多臓器不全で死亡するという事故が起こった。本遺伝子治療は肝臓の血管内にベクターを投与するプロトコルによ

り行われたが、大量に (プロトコル中最大の投与量) 投与されたアデノウイルスベクターにより免疫反応の過剰な活性化が起こり、全身性炎症反応症候群 (systemic inflammatory response syndrome: SIRS) を生じたことが原因と考えられている。この事故は、プロトコルの遂行や管理が適切でなかったこともあり、大きな社会問題となった。これまでにアデノウイルスベクターを血管内に投与するプロトコルによる臨床研究は行われてきたが、この死亡した患者ほどの免疫反応を生じた例はなく、アデノウイルスベクターにより誘発される免疫反応の程度は患者毎に大きく異なることが示唆される。今後、アデノウイルスベクターにより生じる免疫反応の詳細なメカニズム解明とその制御法の開発、および重度の免疫反応を誘発する原因 (予測因子) を明らかにすることが必要となるであろう。

X-SCID 遺伝子治療における白血病の発症は、治療後、2~3 年を経過した後に起こった¹⁴⁾。白血病を発症した 3 例の患者とも、 γc 鎖遺伝子がプロトオンコジンの LMO2 遺伝子の近傍に挿入され、LMO2 遺伝子の活性化によりモノクローンの T 細胞が増殖優位性を獲得したことが白血病化の原因と考えられている¹⁵⁾。造血幹細胞 (CD34 陽性細胞) を用いた遺伝子治療は他の疾病に対しても行われているが、白血病の発症は報告されておらず、X-SCID という特異な疾病と、様々な要因が複合的に絡み合って白血病化に至ったことが推測される。一方で、この事故を経緯に、染色体への遺伝子挿入部位の分析法が新たな基盤技術として確立され、他症例を含むレトロウイルスベクターを用いた遺伝子治療において、遺伝子挿入部位の解析とモニタリング強化が対策として取られている。

また、2007 年 7 月末に、米国において、アデノ随伴ウイルスベクターを用いて TNF- α (tumor necrosis factor- α) レセプターを治療用遺伝子としたリウマチに対する遺伝子治療で死亡例が報告されたが、現在のところ遺伝子治療と死亡との直接的な因果関係の有無も含め、詳細な原因は発表されていない。

4 国外における遺伝子治療臨床研究の動向

1. 癌を対象にした研究動向

2003年には、中国のSiBiono社が世界初の遺伝子治療医薬品であるGendicine (p53を発現するアデノウイルスベクター)を頭頸部扁平上皮癌に対する製剤として認可され、中国においてはすでに多数の患者が遺伝子治療医薬品の投与を受けている⁶⁾。p53を発現するアデノウイルスベクター(Advexin[®], Introgen Therapeutics社)は米国においてもファーストトラック(画期的な新薬について優先的に審査する制度)に指定され、審査中である。Vical社(米国)はステージⅢもしくはⅣの再発進行期メラノーマに対して、MHC (major histocompatibility complex)-1もしくはMHC-I抗原を形成するHLA-B7とβ2ミクログロブリンをコードするプラスミドのカチオニックリポソーム製剤(Allovectin-7)腫瘍内投与により局所および転移癌に対する免疫刺激作用が期待できる)の第Ⅲ臨床試験を行っており、FDAからオーファンドラッグに指定されている。

癌に対する遺伝子治療においては、サイトカインやケモカインを発現するベクターを腫瘍内投与したり、これらを産生する細胞を移植したりすることでワクチン的な治療効果を期待するプロトコルや、p53などの癌抑制遺伝子や自殺遺伝子(ヘルペスウイルス由来のチミジンキナーゼなど)を発現するベクターを腫瘍内に投与するプロトコルによる治療が当初盛んに試みられてきた。しかしながら、遺伝子治療適用患者が既存の治療法では治療効果が得られない末期患者が中心であることも原因であるが、優れた治療効果を示すことは少ないのが現状である。そこで、より積極的に癌を死滅させるアプローチとして、癌細胞でだけ特異的に複製する組換えウイルス(アデノウイルスやヘルペスウイルスが多く用いられる)を用いたウイルス療法が近年盛んに行われている。例えば、Onyx社(米国)が開発を進めているONYX-015は、アデノウイルスの複製に必須のE1Bによってコードされる55キロダルトンのタンパク質を欠損させたウイルス(d11520)であり、p53

を欠損した細胞(多くの癌細胞)で特異的に複製し細胞を殺傷する⁷⁾。ONYX-015は多施設での臨床試験が進められたが、同社は現在開発を中止している。ちなみに、中国ではONYX-015とほぼ同等のウイルス製剤であるH101がすでに医薬品として承認されている。また、腫瘍特異的なプロモーターでアデノウイルスの複製に必須のE1A(とE1B)遺伝子を発現させることで、腫瘍特異的にウイルス複製を生じさせ、細胞を死滅させるアプローチも多数試みられている。一方、ヘルペスウイルスについても、病原性に関連したウイルス遺伝子のγ34.5遺伝子やICP6遺伝子に変異を入れたウイルス(G207)を用いた治療が、脳腫瘍等を対象に行われ、現在更なる改変を加えた組換えヘルペスウイルスの開発が進んでいる。他に、ワクシニアウイルスや麻疹ウイルスを用いたウイルス療法による臨床試験も行われている。

2. その他の疾患を対象にした研究動向

血友病B(血液凝固第Ⅸ因子の欠損による出血性疾患)に対するアデノ随伴ウイルス(adeno-associated virus: AAV)ベクターを用いた遺伝子治療が米国のHighおよびKayらのグループで積極的に進められている。血友病は正常レベルの1~2%の第Ⅸ因子が産生されれば臨床(治療)効果が期待できることから、遺伝子治療の理想的な対象疾患と考えられている。2型AAVベクターを用いた血友病Bに対する前臨床試験では、ベクターを門脈内から投与し、肝臓で第Ⅸ因子を発現させることでマウスおよび血友病Bのモデルイヌにおいて治療レベルの第Ⅸ因子の発現が長期間(1~2年以上)続く良好な結果が得られていたため⁸⁾、臨床研究での成功も有望視されていた。当初の臨床研究はより安全性の高いと考えられる骨格筋を標的として行われたが、有効なレベルの凝固因子の血中濃度上昇が認められた例は少なかった^{9), 10)}。そこで本来の第Ⅸ因子産生臓器である肝臓を標的とした治療が行われ、治療レベルの凝固因子の産生が見られたが、動物実験の場合とは異なり、効果は一過性であった¹¹⁾。その原因について解析したところ、投与されたAAVベクター(中のカプシドタンパク質)が肝細胞に外来性抗原として抗原提示され、遺伝子導入細胞が免疫系に排除されて

いることが明らかとなった。動物実験では（おそらく提示された抗原が免疫反応を惹起するレベルにまで達していなかったため）遺伝子導入細胞の排除は認められなかったが、ヒトではより高感度にこのような免疫反応を起こすことが示され、より低容量のベクター投与でも治療効果が期待できる新たなAAVベクターの開発、あるいはベクター投与時に免疫抑制剤で一時的に免疫を抑制する必要性が考えられた。なお、血友病患者の場合、産生された凝固因子そのものが異物と認識される可能性もあるが、幸運にも抗凝固因子抗体の産生は認められなかった。現在、免疫抑制剤との併用による遺伝子治療臨床研究の準備が進められている。

パーキンソン病に対しては、主にAAVベクターを用いて、様々な遺伝子（アプローチ）で臨床研究が進められている。芳香族アミノ酸脱炭酸酵素（AADC: L-DOPAをドパミンに変換する酵素）を線条体に発現させ、L-DOPAの内服と組み合わせで効果を期待するアプローチは米国で既に臨床研究が進められており、わが国でも2007年、自治医科大学が同様のアプローチによる遺伝子治療を開始した。また、米国コーネル大学のグループは最近、神経細胞の活動を抑制することを目的にGAD (glutamic acid decarboxylase; 抑制性神経伝達物質のGABA (γ -アミノ酪酸)の産生に必要な酵素) 遺伝子を投与するアプローチで、治療3カ月後より治療効果が認められ、少なくとも1年間の病状の改善が認められたことを報告している¹⁹⁾。

最近、Cardium Therapeutics社（米国）が開発を進めている血管新生促進遺伝子治療製剤Generx (FGF-4 [Fibroblast Growth Factor-4]) を発現するアデノウイルスベクターが冠動脈疾患による再発性狭心症を対象として米国においてファーストトラック指定を受け、医薬品化が期待されている。

5 国内における遺伝子治療臨床研究の動向

わが国における遺伝子治療臨床研究は、欧米と

比較するとかなり遅れているのが実情であるが、最近の国内における遺伝子治療臨床研究（試験）の特徴としては、ベンチャー企業などが先導して臨床研究（試験）を展開していることである。大阪大学発のベンチャーであるアンジェスMG社は、末梢性血管疾患（閉塞性動脈硬化症）に対してHGF (Hepatocyte growth factor) 発現naked DNAを筋肉内に注射することで血管新生を誘導する臨床試験を進め、第Ⅲ相試験でプラセボ群と比べ有効性に顕著な差を認めている。現在承認申請に向けた準備を進めており、初の『目の丸』遺伝子治療医薬品』となることが期待される。岡山大学発のベンチャーであるオンコリスバイオファーマ社は、癌細胞特異的なプロモーターを利用してE1A, E1Bタンパク質を発現させることにより癌細胞特異的に複製可能なアデノウイルス製剤 (telomelysin) の開発を進めており、2006年末に米国において進行性の乳がん患者に対する第Ⅰ相試験を開始した。大阪大学発のベンチャーであるクリングルファーマ社は、血管新生阻害活性を有するNK4を発現するアデノウイルスベクターを用いた癌に対する遺伝子治療臨床試験を計画中である。神戸大学発のベンチャーであるジーンメディクスジャパン社は、癌細胞特異的に複製するアデノウイルスを産生するキャリア細胞を利用した癌に対する臨床試験を米国および中国で計画中である。同社は、遺伝子治療用ベクターの製造および細胞治療用セルプロセッシングをGMP (good manufacturing practice) 準拠にて行うことが可能な施設を備えており、ウイルスベクター製品の受託製造を行っていることも大きな特徴である。ディナベック社は、独自開発したセンダイウイルスベクターを用いて重症虚血肢に対してFGF-2を発現させ、血管新生を誘導する遺伝子治療を2006年九州大学で開始している。同社は中国のSiBiono社とエイズワクチン開発に関する契約を締結しており、わが国で開発された技術が海外にも導出されている。タカラバイオ社は、韓国と中国で関連会社などを通して、それぞれ慢性肉芽腫症および癌に対する遺伝子治療の計画を進めている。

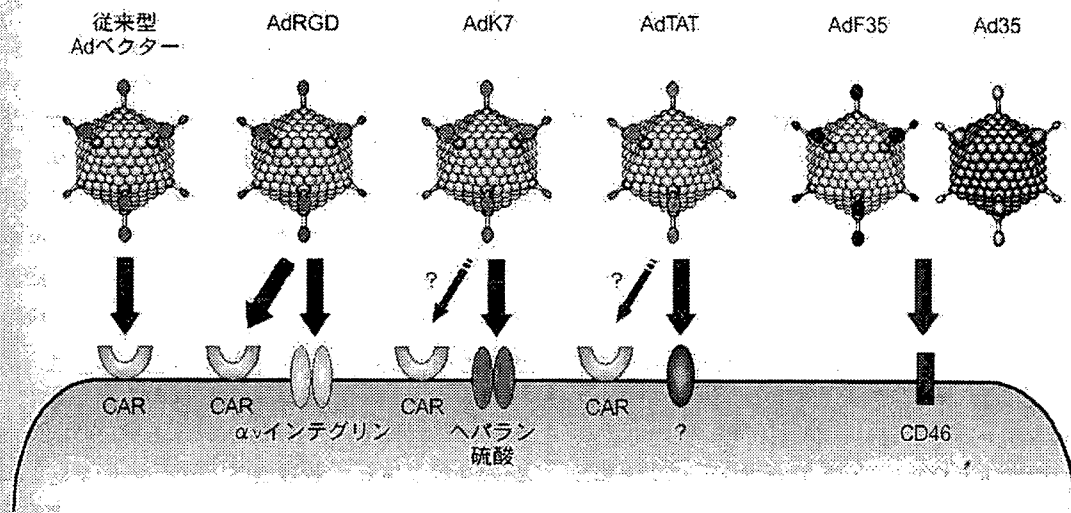
6 遺伝子治療を支える基盤技術の開発動向

これまで行われてきた遺伝子治療臨床研究は、主に1990年代に開発された第一世代のベクターが主に用いられてきたが、臨床研究での効果が十分でないことや、有害事象の発生などもあって、より安全性および有効性の高いベクターの開発や、遺伝子治療を支える周辺基盤技術の開発が積極的に進められている。以下に、各種ベクター系開発の最近の進歩について簡単に解説する。

1. アデノウイルスベクター

従来のアデノウイルスベクターはヒト5型アデノウイルスを基盤としたものであるが、本ベクターは、① 遺伝子導入がアデノウイルス受容体 (coxsackievirus and adenovirus receptor: CAR) の発現に依存し、CARの発現がない細胞(特に悪性度の高い癌細胞や血液系細胞等)へは遺伝子導入できないこと、② 免疫反応を伴うこと、な

どの問題点があった。①に関しては、細胞との結合を担うウイルスカプシドタンパク質のファイバー表面上に、特定の細胞受容体との結合を担うペプチド配列を挿入したり、ファイバー部分や全てのウイルスタンパク質をCAR以外の分子(ヒト由来細胞ではほぼ全ての細胞に発現が認められるCD46など)を認識する他のアデノウイルス由来のものに置換したりしたベクターが開発されている。(図1)¹⁹⁾。②に関しては、ウイルスコード遺伝子を全て除去した gutted アデノウイルスベクターを用いてウイルスタンパク質の産生を欠失させたベクターや¹⁹⁾、ファイバー領域を変更することで *in vivo* 投与後の免疫担当細胞への感染を減弱させたベクターが開発されている¹⁹⁾。また、gutted アデノウイルスベクターに、Sleeping Beauty¹⁹⁾ やバクテリオファージインテグラーゼΦC31¹⁷⁾、レトロトランスポゾン¹⁸⁾の染色体への遺伝子組み込み活性を付与することで、導入遺伝子が積極的に染色体に組み込む活性をもたせたアデノウイルスベクターの開発も進められており、



■図1 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 (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、全ての構造タンパク質が35型アデノウイルスからなるベクター (Ad35) は、CD46を認識して感染する。アデノ随伴ウイルスベクターにおいても、アデノウイルスベクターと同様のカプシド改変ベクターや血清型を変更したベクターの開発が進んでいる。

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歩に進み、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ェ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)~21)}。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²²⁾。

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。米国のサンゴモ・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(スクレアーゼドメイン)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

B 5 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

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

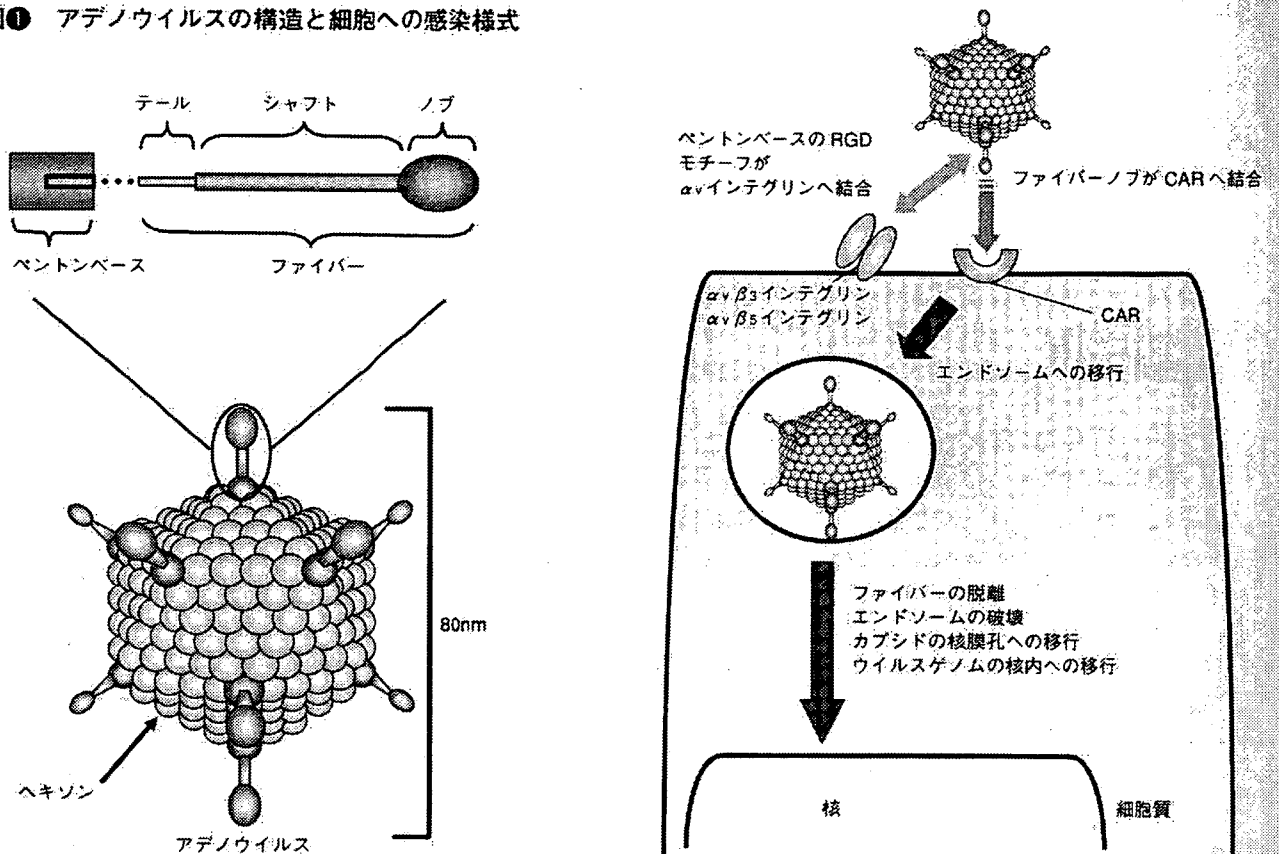
ウイルスベクターの開発研究は、遺伝子治療の進展とともに発展しており、これまでの遺伝子治療臨床研究で用いられてきた第一世代のウイルスベクター (ウイルス表面タンパク質の改変などを伴わないベクター) の限界を克服できる第二世代のウイルスベクターの開発研究が、ウイルス (ベクター) 学や遺伝子工学、ナノサイエンス (多くのウイルスは直径数十~数百 nm のサイズである) の発展とともに活発に行われている。本稿では、直径約 80nm のアデノウイルスの表面タンパク質を遺伝子工学的に改変することで感染域を制御できる改良型アデノウイルスベクターの開発研究について解説する。

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 [カプソメア: 240 個のヘキサソンと 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³⁾、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ペントン（ペ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、その後ペントンベースの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。

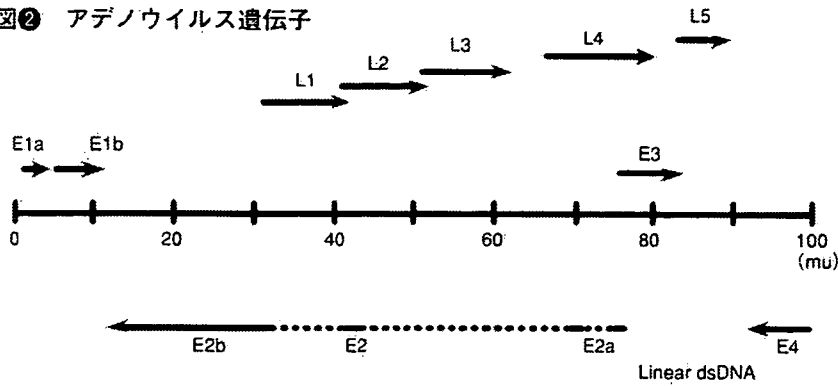
すべてのアデノウイルスのプロモーターが活性化される)を削除し、この領域を外来遺伝子に置き換えることにより増殖不能ウイルスとしている（E1欠損領域以外の領域に外来遺伝子を挿入する場合もある）。アデノウイルスベクターを増幅する場合には、E1タンパク質をトランスに供給できる細胞株である293細胞¹⁹⁹³などを使用する。

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²⁰⁾〕、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

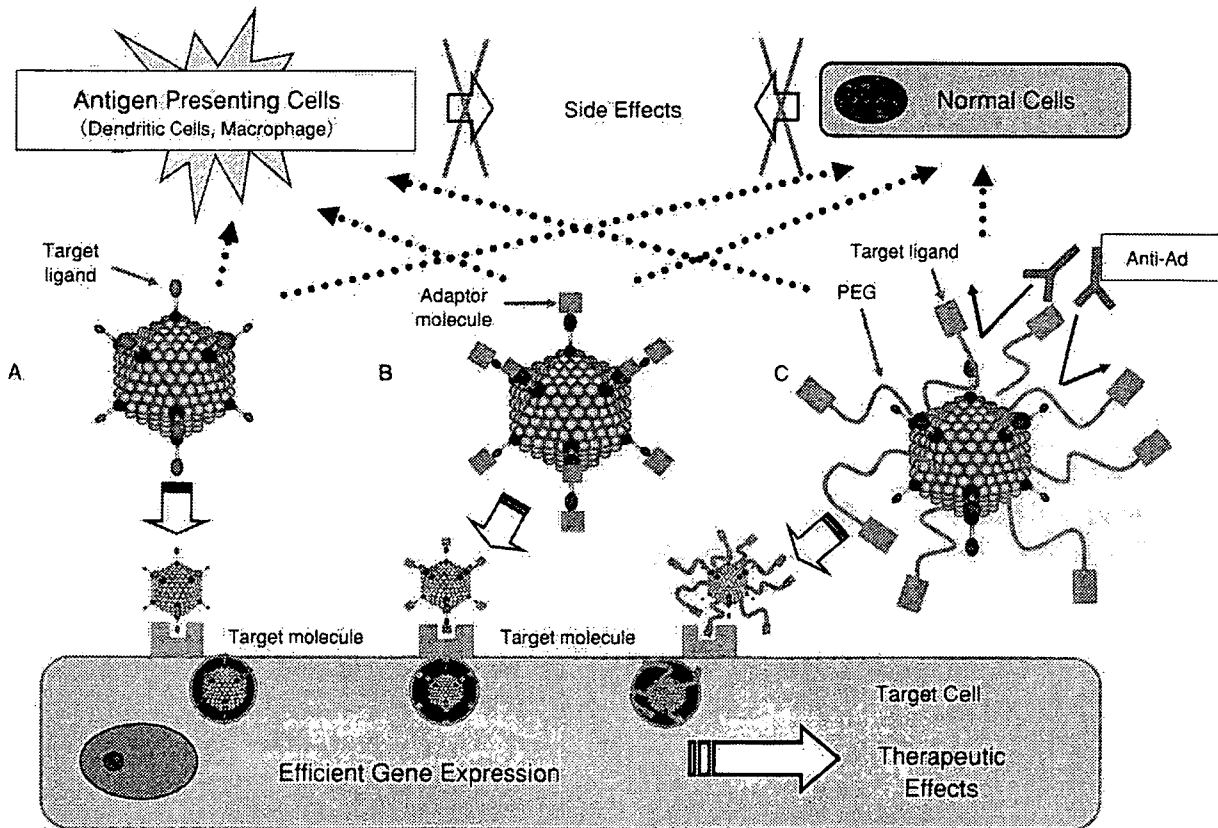
伝子が希釈されることで、一過性の遺伝子発現を示す。一方、分化した増殖停止期の細胞に対しては、アデノウイルスに対する免疫の問題が克服されれば、数ヶ月以上の長期の遺伝子発現を示す²¹⁾）、③他のウイルスベクターに比べ圧倒的に高いタイター（力価）のベクター（通常、他のベクターに比べ1000倍以上）が得られること、などの長所を有し、ベクターとしての優れた基本的性質を有している。

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。

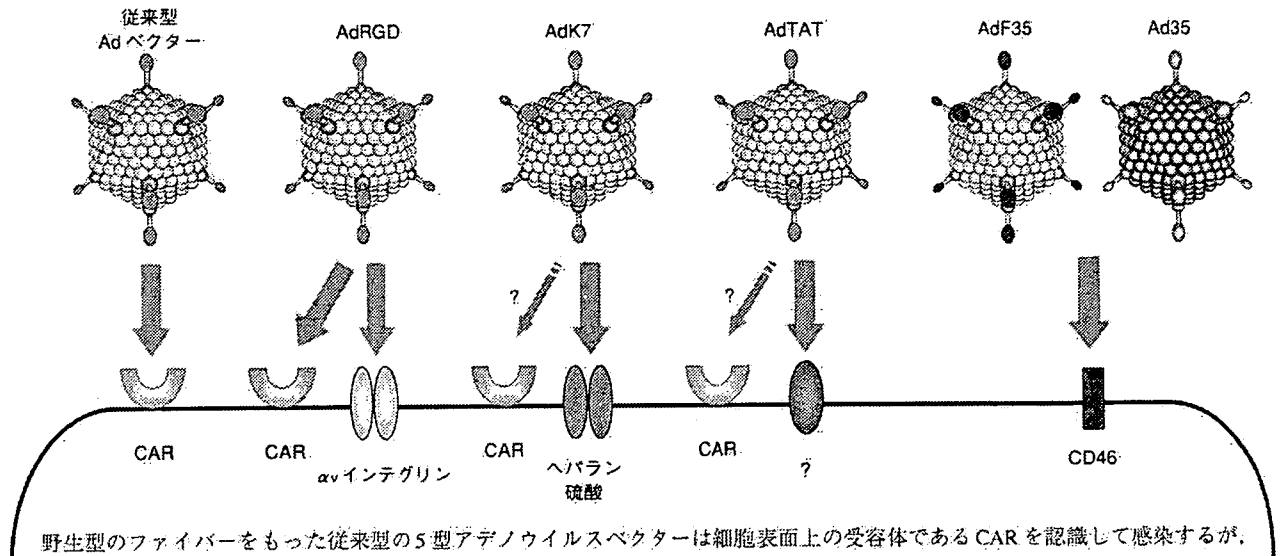
- A: ウイルスカプシドの遺伝子工学的改変
- B: アダプター分子の使用による生化学的改変
- C: リガンドを付与した高分子による化学的改変

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)

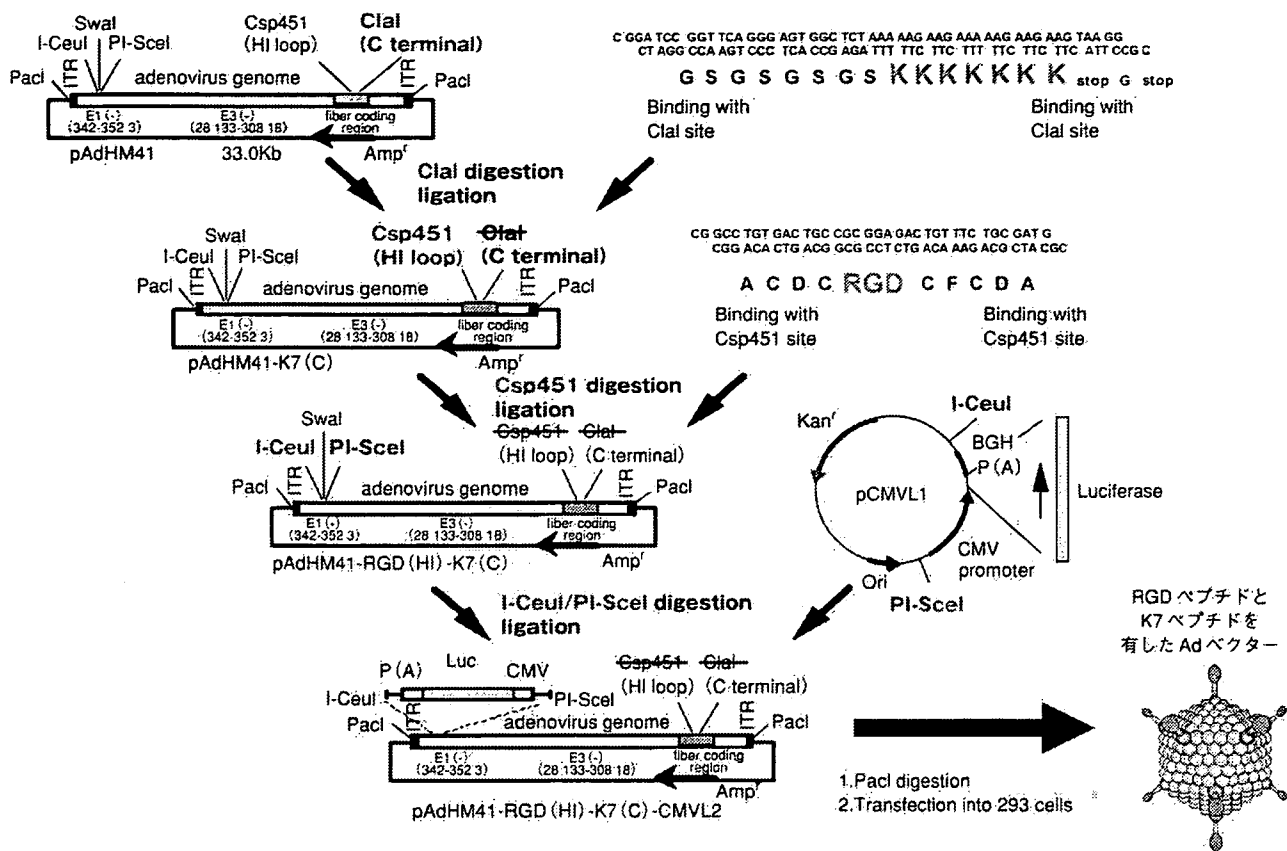
去の総説⁴⁾や共同研究者の倉知らの解説⁵⁾を参照されたい。

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⁾¹¹⁾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



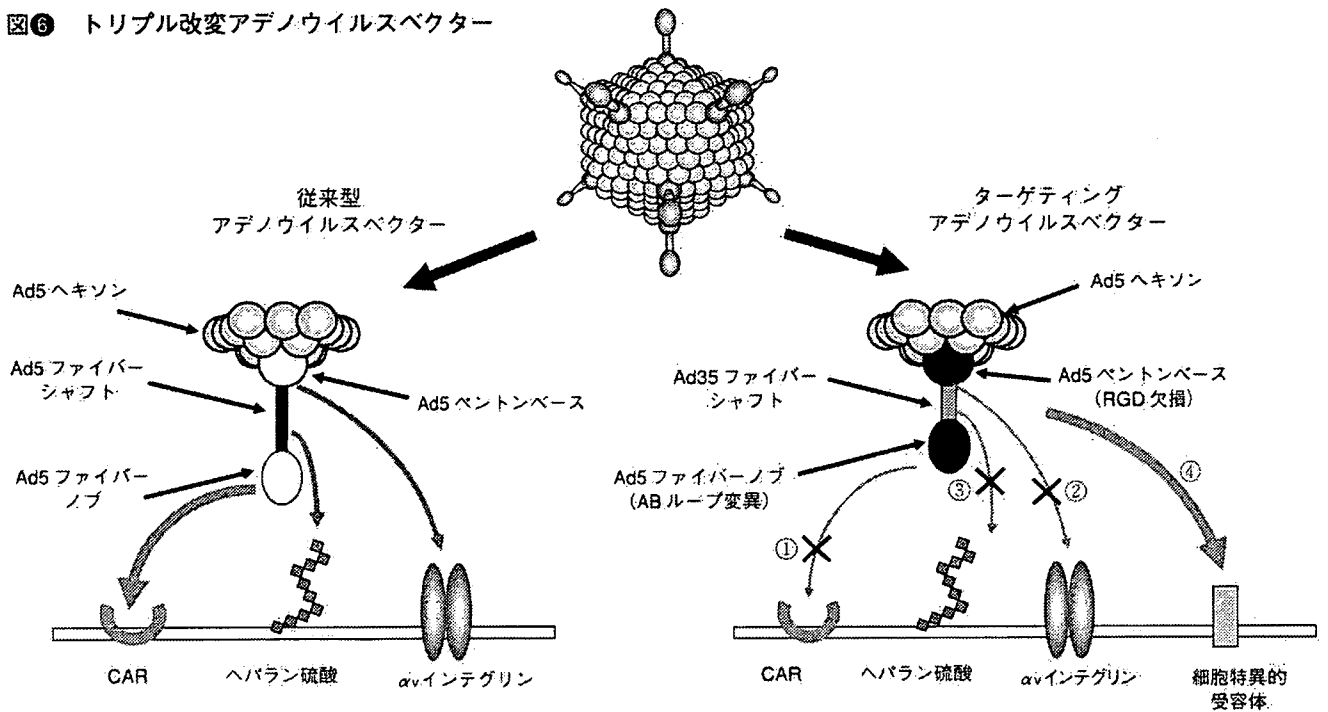
ファイバーノブのHI ループあるいはC末端をコードする遺伝子配列部分にユニークな制限酵素である Csp45I あるいは ClaI の切断部位 (それぞれ) をもったベクタープラスミド pAdHM41 を両酵素で切断し、挿入したいペプチド (この場合 RGD 配列およびポリリジン配列) に相当する合成オリゴDNA を *in vitro* ライゲーションで導入する。その後、I-CeuI と PI-SceI 部位を利用して *in vitro* ライゲーションでルシフェラーゼ遺伝子を E1 欠損部位に挿入する。生じたプラスミドをウイルスゲノム両末端に存在する PaclI 部位で切断し、293 細胞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¹⁰⁾。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)。

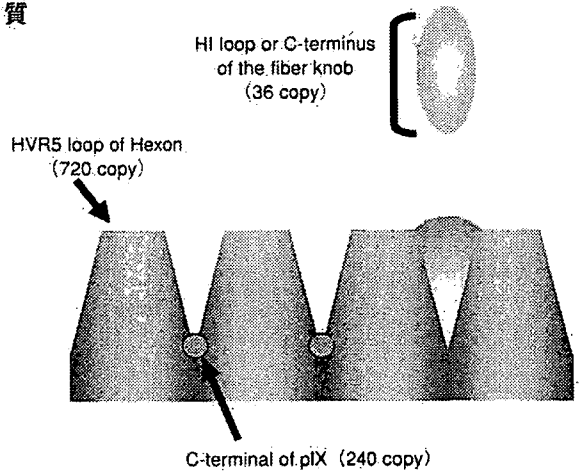
一方、*in vivo* において標的細胞特異的に遺伝子導入可能なターゲティングアデノウイルスベクターの開発も進んでいる。この場合、ネイティブのアデノウイルスが持つ感染能を消失させて、細胞特異的受容体を認識して感染できるように改変を行う必要がある。アデノウイルスは前述のようにファイバーと CAR との結合が感染に重要な役割を果たすが、低親和性であるがペントンベースの RGD モチーフやファイバーシャフトの KKTK モチー

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。

プが 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、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,

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。

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科

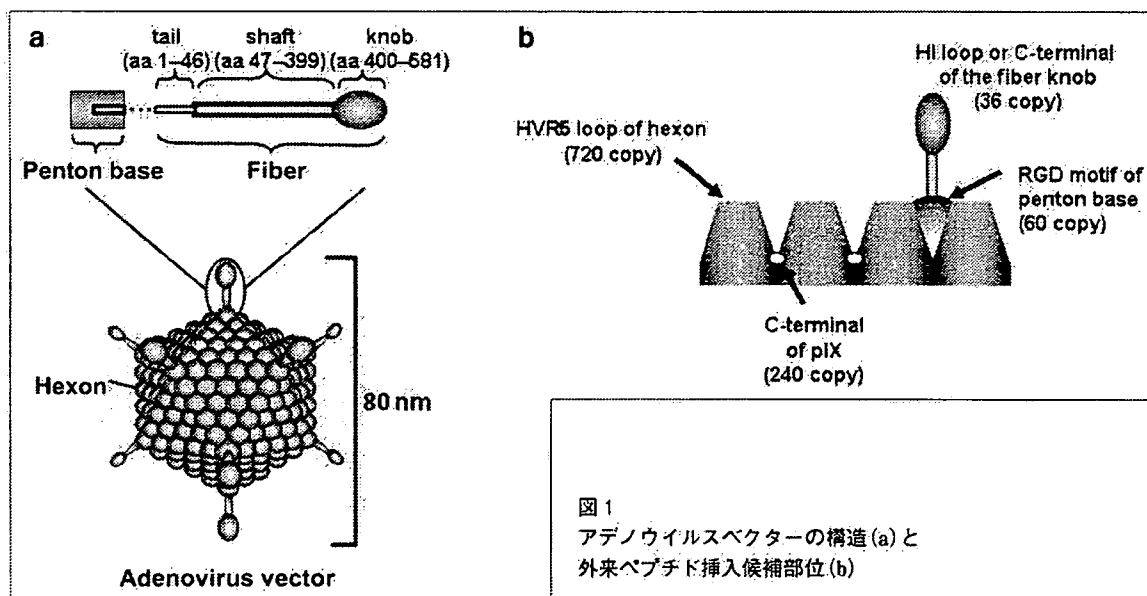


図1
アデノウイルスベクターの構造(a)と
外来ペプチド挿入候補部位(b)

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

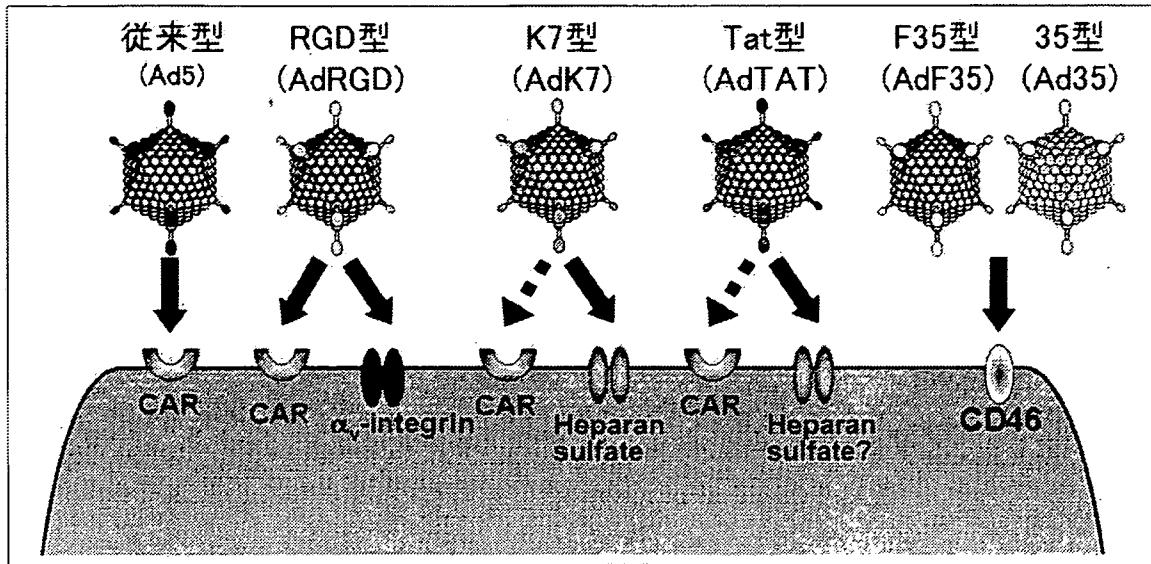


図2 筆者らが独自に開発した改良型アデノウイルスベクター

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-EFla-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。