

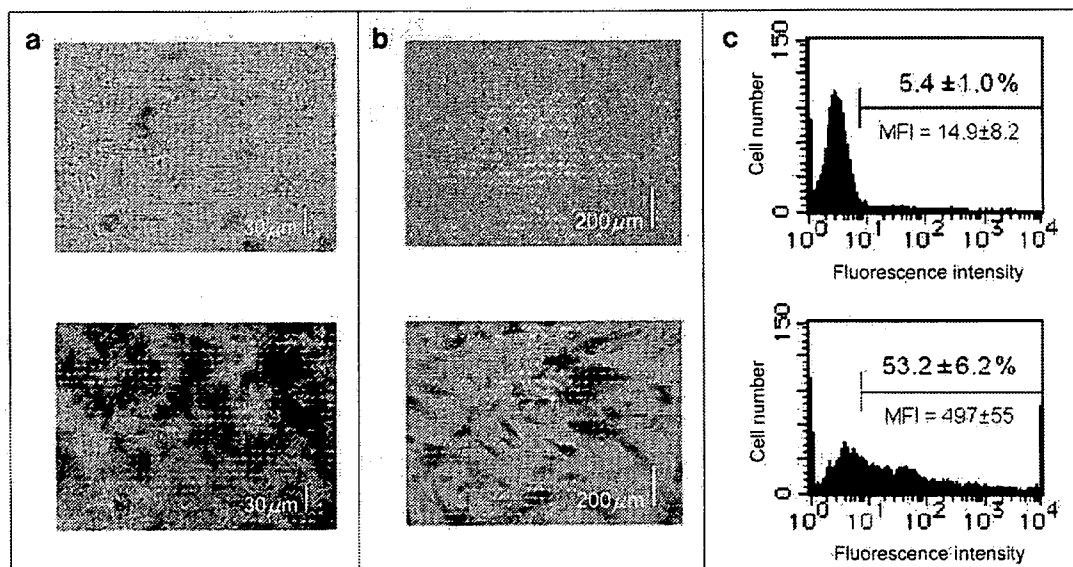


図3 改良型アデノウイルスベクターによる各種幹細胞への高効率遺伝子導入

- 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 を用いたエレクトロポレーション法(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くらべ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細胞に対し分化に参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、細胞分化に参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ター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つけるため、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与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、ホーミングに関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) Toimpers DM, Labosky PA : Electroporation of murine embryonic stem cells : a step-by-step guide. *Stem Cells* 22 : 243-249, 2004.
- 20) Cherry SR, Biniszkiewicz 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) Conger 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 Cocksackie-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 MDRI 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。

櫻井文敦 (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

アデノウイルスベクター開発の 最前線

水口裕之

従来のアデノウイルスベクターの問題点（免疫反応を生じることや感染域の制限など）を克服し、機能性（ターゲティング能の付与など）に優れた次世代アデノウイルスベクターの開発が進んでいる。本稿では、主に遺伝子工学的手法を用いたアデノウイルスベクターの改良研究の最前線について解説する。

はじめに

遺伝子治療の実用化といっそうの進展に向けての最大の鍵は、高い安全性を確保し、治療目的遺伝子を必要な細胞に効率良く導入し、目的に応じて自由に発現させる技術の開発である。これまで施行されてきた遺伝子治療臨床研究は、主に1990年代に開発された古典的なベクターを用いたものであり、米国でのアデノウイルスベクター投与に伴う死亡事故や、フランスでの白血病の発症といった例外的な事例はあるものの、安全面での評価はほぼ終わり、今後はより有効性に重点を置いた臨床研究が主流になってくるものと思われる。そのためには、機能面で優れた改良型ベクターの開発と実用化が必要不可欠であり、これにより遺伝子治療の安全性・有効性の大幅な増進が期待できる。

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^{*1}、②導入遺伝子が宿主染色体へ組み込まれることなく、染色体外にエピソード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^{*2}、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1,000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遺伝子導入が標的細胞のアデノウイルス受容体（coxsackievirus and adenovirus receptor : 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なこと、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われわれや欧米を中心に盛んに行われている。本稿では、次世代アデノウイルスベクター開発の最前線について解説する。

1. 標的細胞指向性の制御

i) 遺伝子導入時のCAR依存性を克服したアデノウイルスベクターの開発

従来用いら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5型（あるいは2型）のヒトアデノウイルスを基盤としている。ヒトアデノウイルスはAからFまでのサブグループに分けられ、少なくとも51種類のserotypeが知られているが、サブグループBに属するウイルスを除き、多くのアデノウイルスは受容体としてCARを認識して細胞に感染する（図1）¹⁾。CARの発現が乏しいために従来の5型アデノウイルスベクターでの効率の良い遺伝子導入が困難な細胞種は意外と多く、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、骨格筋細胞、滑膜細胞などが知られている。また、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の低下が報告されており²⁾、本ベクターを用いて癌を対象とした遺伝子治療臨床研究を進めるうえで考慮すべき問題と考えられている。

*1 : センダイウイルスベクターも遺伝子発現効率に優れていることが報告されているが、本ベクターは他の一般的なウイルスベクターと異なり、細胞内に導入された遺伝子が増殖するという特異な性質を有することから、他のベクターと同列に比較することは困難である。

*2 : 細胞増殖に伴い導入遺伝子が希釈されるため、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、後述するようにアデノウイルスに対する免疫の問題が克服されれば、数ヶ月以上の長期間の遺伝子発現を示すことが知られている。

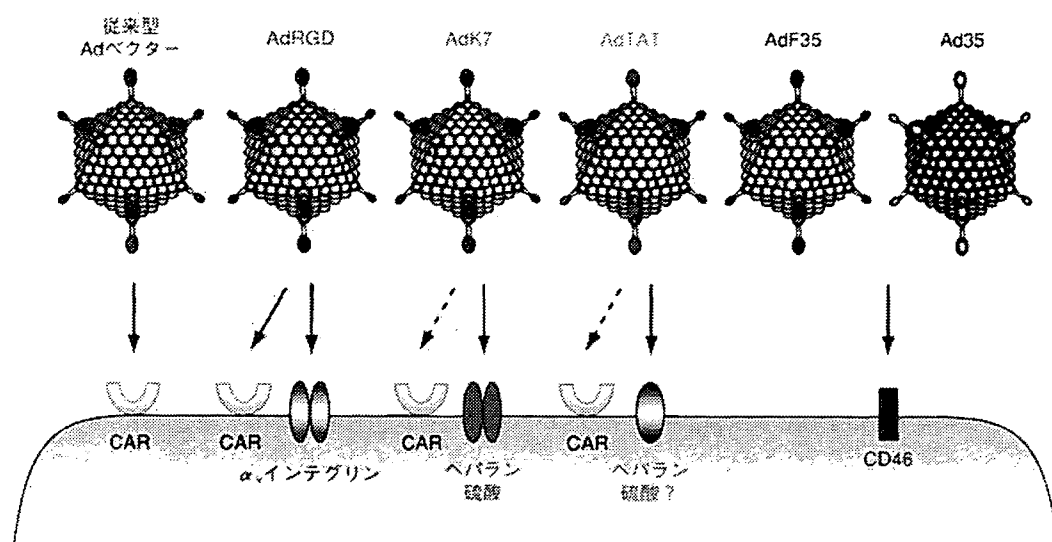


図1 ●各種改良型アデノウイルスベクター

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。

アデノウイルスベクターによる遺伝子導入時のCAR依存性を克服するために、ファイバータンパク質³⁾を改変した改良型ベクターの開発が進んでいる。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をファイバー表面上に遺伝子工学的に表現させることにより、CARを発現していない細胞に対しても効率良く遺伝子導入できる（図1）^{31,4)}。われわれは最近、HIV（human immunodeficiency virus）由来のタンパク質導入ドメイン（Protein Transduction Domain：PTD）として知られているTatペプチドをファイバーに付与することで、RGD配列やポリリジン配列を付与したベクターよりも、より広範に効率良く外来遺伝子を発現可能であることを見出し、その応用が期待される。

また、ファイバー部位をCAR以外の分子を認識する他の血清型のアデノウイルスのファイバーに置換することでも、遺伝子導入時のCAR依存性を克服することができる。例えば、ヒト由

来細胞であればほとんどすべての細胞に発現が認められるCD46を受容体としている11・35型アデノウイルス由来のファイバーを付与することで、5型アデノウイルスベクターでの効率の良い遺伝子導入が困難な造血幹細胞、樹状細胞などへの効率の良い遺伝子導入が可能になる^{31,4)}。

ii) 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

ターゲティング能を有したベクターの開発は、全身投与での治療効果が期待できるだけでなく、たとえ局所にベクターを投与した場合においても、標的細胞以外への感染、拡散を防ぐことが期待できることから、重要な研究課題である。目的の組織でだけ遺伝子を発現させることが可能なアデノウイルスベクターの開発には、①キャプシドタンパク質の遺伝子工学的な改変、②抗体やタンパク質、高分子を用いたベクター表面の修飾、あるいは③組織特異的プロモーターの利用などの方法がある。最終的には、これらの組み合わせが好ましいが、ベクター自身を

*3：ファイバータンパク質テール、シャフト、ノブからなり、ノブ領域がCARと結合する。

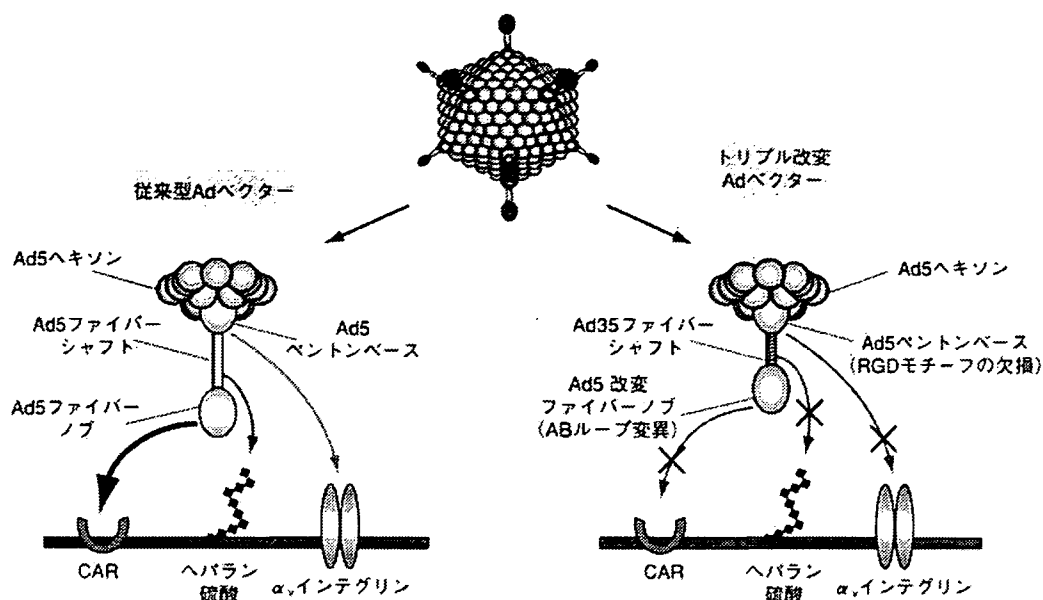


図2 ●ターゲティング能を有したアデノウイルスベクター

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、まず、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たベクター（トリプル改変ベクター）を開発する必要がある。次に、トリプル改変ベクターに標的細胞特異的に結合するリガンドなどを付与することで、ターゲティング能を有したアデノウイルスベクターが開発できる

改変する①が最も基本的で重要な基盤技術になると考えられ、精力的に研究が進められている。

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し、低親和性であるがファイバーの根本に存在するペントンベースのRGDモチーフやファイバーシャフトのKKTKからなるヘパリン結合ドメインが、 α_5 インテグリンやヘパラン硫酸と結合して起こる感染ルートも知られている⁷⁾。また最近では、factor Xなど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⁸⁾。これらの感染経路を遮断して、標的細胞特異的に結合するリガンドなどをウイルス表面タンパク質のファイバーやヘキソン、protein IX領域¹⁴⁾（われわれはこれらの領域に簡便に外来リガンドを挿入する技術も開発済みである²⁾）に付与すれば、ターゲティング能を有したアデノウイルスベクターが開発

できる。われわれはファイバーノブ、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ベクターを開発し（図2）、このベクターが肝臓をはじめとする *in vivo* での遺伝子発現能をほとんど消失していることを明らかにしている¹⁰⁾¹¹⁾。現在このトリプル改変ベクターに、標的細胞特異的に高親和性を示すリガンドを付与することでターゲティング能をもったアデノウイルスベクターの開発を進めている。

2. 免疫反応の制御

アデノウイルスベクターを生体に投与した場合、大別すると、①ベクター投与後数時間以内に生じるベクター粒子そのものに対する自然免疫、②7～10日以内に生じるベクターにより産生されたウイルスタンパク質（および外来遺伝子産物）に対する細胞性免疫、そして、③ウイルスタンパク質に対する液性免疫の3種類の免

* 4 : protein IX領域
ヘキソンとヘキシンの間に存在するタンパク質。

疫反応が起こることが報告されている。これらの免疫反応を克服できるベクターや投与方法（投与戦略）の開発は、安全性や有効性の高い遺伝子治療の実現にとって必要不可欠である。

i) 自然免疫の制御が可能な

アデノウイルスベクターの開発

ウイルスをはじめとする異物を生体に投与すると、生体は即座にインターフェロンやサイトカイン、ケモカインなどを産生し、それらの異物を排除しようとする自然免疫が発動する。アデノウイルスベクターを生体に投与した場合にも自然免疫の活性化は生じ、1999年に米国で起こったオルニチントランスカルバミラーゼ欠損症に対するアデノウイルスベクターを用いた死亡事故では、自然免疫の過剰な活性化が原因と考えられている。

アデノウイルスベクターをマウスに全身投与した場合には、IL-6、IL-12などの産生が投与3時間以内に生じる。全身投与されたベクターの90%以上は肝臓（実質細胞とクッパー細胞^{*5}）をはじめとする非実質細胞に移行するが、多くの炎症性サイトカインは肝臓（のクッパー細胞）ではなく、主に脾臓で分泌される¹⁰。したがって、脾臓への移行性を抑えたベクターは、炎症性サイトカインの産生が低い。例えば、前述したポリリジンでファイバーを修飾したアデノウイルスベクターでは、脾臓への移行性が減少する結果、血中へ分泌されるIL-6は約1/4にまで減少する（肝臓をはじめとする各臓器での遺伝子発現は従来型ベクターと同等以上に起こる）¹⁰。また、CAR、インテグリン、ヘパラン硫酸との結合性を欠損させたトリプル改変ベクターにおいては、IL-6はほとんど産生されない¹¹。興味深いことに、従来のアデノウイルスベクターを投与した場合に生じるAST (aspartate aminotransferase) やALT (alanine transferase) などの肝傷害性マーカーの産生も、ポリリジン型ベクターやトリプル改変ベクターではほとんど全く起こらず^{11,12}、安全性が高いことが明らかとなっている。

ウイルスなどの病原体を認識する細胞上のセンサー受容体として、近年TLR (Toll Like Receptor) が注目されている。TLR3を除くTLRが利用しているアダプタータンパク質のMyD88欠損マウスを用いたわれわれの検討では、アデノウイルスベクター刺激による樹状細胞でのIL-6産生にはMyD88が関与するものの、マクロファージでのIL-6産生にはMyD88には関与せず、細胞種によりIL-6の産生メカニズムが異なっていることが明らかとなった¹³。さらに*in vivo*での血中IL-6の産生は、MyD88欠損マウスにおいても野生型マウスと同程度に起こり、TLR以外の経路が*in vivo*におけるIL-6産生に大きく寄与していることが示唆された。アデノウイルスベクター投与に伴う自然免疫に関与する生体側因子やウイルス側因子、シグナル伝達機構の解明は、自然免疫応答の克服に向けて重要な研究課題であり、われわれのグループでは、各種改変アデノウイルスベクターやノックアウトマウス、RNAi技術、マイクロアレイ解析を通して、これらの研究を進めている。

ii) 細胞性免疫の制御が可能な

アデノウイルスベクターの開発

アデノウイルスベクターを生体に投与すると、通常数週間から数カ月間の一過性の遺伝子発現を示す。しかしながら、免疫不全マウスにおいては、数カ月から1年以上（場合によっては一生涯）にわたる長期間の遺伝子発現を示すことから¹⁴、免疫系による遺伝子導入細胞の排除が一過性の遺伝子発現の原因と考えられている。すなわち、従来のアデノウイルスベクターは、ウイルスの増殖やウイルスタンパク質の合成に必須のE1遺伝子領域を除去することで、ウイルスタンパク質の産生が生じないように設計されているが、E1遺伝子非依存的に他のウイルスタンパク質の合成がわずかながら起こり、これが免疫系のターゲットとなることが明らかになっている。この問題を克服するために、ウイルスコード遺伝子をすべて除去したguttled アデノウイルスベクターが開発されており、本ベクターを

*5: 実質細胞とクッパー細胞

肝臓は肝実質細胞（肝細胞）の他に、クッパー細胞、胆管内皮細胞、星細胞、胆管上皮細胞などの肝非実質細胞から構成される。

*6: 増殖停止期の終末分化した細胞に遺伝子導入した場合には、導入遺伝子が染色体外にエキソソームとして存在するアデノウイルスベクターにおいても長期間の遺伝子発現を示す。

用いた場合は、通常のマウスにおいても長期間の遺伝子発現が認められる¹⁰⁾。従来は、高タイターの gutted アデノウイルスベクターの産生が技術的に難しいのが課題点であったが、最近ヘルパーウイルスとパッケージング細胞の改良により、その問題点は一部克服されつつある¹¹⁾。また、gutted アデノウイルスベクターに、Sleeping Beauty¹²⁾ やバクテリオファージインテグラーゼφC31¹³⁾、レトロトランスポゾン¹⁴⁾ 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まれる性質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、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。

iii) 液性免疫の制御が可能な

アデノウイルスベクターの開発

成人の約60%はヒト5型アデノウイルス（サブグループCに属する）に対する抗体を保持していることが知られている。また、アデノウイルスベクターを投与された個体は、抗アデノウイルス抗体を生じるため、2回目以降のベクターの全身投与では遺伝子発現をほとんど示さない⁷⁾。主要キャプシドタンパク質のヘキソンに対する抗体が液性免疫の主体であることから、ヘキソン改変ベクターが、この問題を克服するために開発されている¹⁵⁾。また、異なった血清型（サブグループBに属する11型や35型）や異なった種（チンパンジー、イヌ、ヒツジ、トリ、ウシ、マウスなど）に属するアデノウイルスベクターが開発されており、これらのなかには、CAR以外の受容体を認識して感染するものもあり、感染域を変えることも可能になる。例えば、われわれは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の開発に成功したが¹⁶⁾、35型アデノウイルスに対する成人の抗体保持率は低く、本ベクターは5型アデノウイルス抗体存在下でも高い遺伝子発現を示す。35型アデノウイルスはCD46を受容体として感染し、造血幹細胞などの5型アデノウイルスベクターでの遺伝子導入が困難な細胞への遺伝子導入に優れ

ていることが明らかとなっている^{21,22)}。

3. 基礎研究への応用

アデノウイルスベクターはわれわれが開発したプラスミド構築に基づいた簡便なベクター作製法が開発されたこと^{23,24)}（クロンテック社よりキット化）、高力価のウイルス液が得られること、遺伝子発現効率が高いことなどから、遺伝子機能解析などの基礎研究のための貴重なツールとして広く利用されている。さらに、前述した改良型ベクターにより、従来のベクターでは遺伝子導入が困難であった多くの細胞種への劇的な遺伝子導入効率の改善が可能になっており、汎用性は益々高くなっている。

アデノウイルスベクターは全身投与した場合には、肝臓に90%以上のベクターが移行し、100%の肝細胞で遺伝子発現が起こる。また、臓器局所にベクターを投与した場合には、投与部位での高効率な遺伝子発現が期待できる。目的組織がCAR陰性の場合には、ファイバーを改変したベクターを用いることで遺伝子発現効率の上昇が期待できる。例えば、CAR陰性のB16メラノーマの腫瘍内にベクターを投与した場合には、RGD ペプチドを付与したファイバー改変ベクターでは従来型ベクターに比べ約40倍もの遺伝子発現を示す²⁵⁾。また、遺伝子導入が物理的な問題により容易でない脾臓ランゲルハンス島（脾島）β細胞に対しては、腹腔動脈からアデノウイルスベクターを *in vivo* 投与し、その後脾臓を初代培養することで高効率な遺伝子発現が得られることが明らかとなっており（ランゲルハンス島の内部の細胞においても、高効率な遺伝子発現が得られる）²⁶⁾。糖尿病の分子メカニズムの解明や治療に向けた研究分野への強力なツールになると期待される。さらに、35型アデノウイルスの受容体であるCD46を全身の臓器で発現しているトランスジェニックマウス（CD46は細菌類ではほとんど発現していない）を用いた各組織局所への35型ベクターを用いた遺伝子導入系は、基礎研究における実験系としてきわめて有効で

*7:
局所投与された場合は、複数
回の投与でも有効である。

ある。

おわりに

本稿で紹介したように、アデノウイルスベクターの改良はさまざまな方向から精力的に進められている。最終的には、前述の各種改変技術を組み合わせたり、化学的手法によるベクター改変や組織特異的プロモーターの利用、導入する個々の遺伝子（あるいは siRNA 発現ベクターとして）の特性を考慮に入れて活用することで、アデノウイルスベクターは遺伝子治療への応用や基礎研究のツールとして益々有効な技術になると考えられる。今後、このような改良型アデノウイルスベクターの開発が、遺伝子治療臨床研究の成功や遺伝子治療の普及、さらには生命科学の発展という成果となって現れることを期待している。

参考文献

- 1) Bergelson, J. M. et al. : Science, 275 : 1320-1323, 1997
- 2) Okegawa, T. et al. : Cancer Res. 61 : 6592-6600, 2001
- 3) Mizuguchi, H. et al. : Gene Ther. 8 : 730-735, 2001
- 4) Koizumi, N. et al. : J. Gene Med. 5 : 267-276, 2003
- 5) Sakurai, F. et al. : Gene Ther. 10 : 1041-1048, 2003
- 6) Rea, D. et al. : J. Immunol. 166 : 5236-5244, 2001
- 7) Mizuguchi, H. et al. : Hum. Gene Ther. 15 : 1022-1033, 2004
- 8) Shayakhmetov, D. M. et al. : J. Virol. 79 : 7478-7491, 2005
- 9) Kurachi, S. et al. : Gene Ther. 14 : 266-274, 2007
- 10) Koizumi, N. et al. : J. Virol. 77 : 13062-13072, 2003
- 11) Koizumi, N. et al. : Hum. Gene Ther. 17 : 264-279, 2006
- 12) Koizumi, N. et al. : J. Immunol. 178 : 1767-1773, 2007
- 13) Yamaguchi, T. et al. : submitted
- 14) Donna, J. P. et al. : Hum. Gene Ther. 16 : 1-16, 2005
- 15) Palmer, D. et al. : Mol. Ther. 8 : 846-852, 2003
- 16) Yant, S. R. et al. : Nature Biotechnol. 20 : 999-1005, 2002
- 17) Ehrhardt, A. et al. : Mol. Ther. 15 : 146-156, 2007
- 18) Kubo, S. et al. : Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 103 : 8036-8041, 2006
- 19) Roberts, D. M. et al. : Nature, 441 : 239-243, 2006
- 20) Sakurai, F. et al. : Gene Ther. 12 : 1424-1433, 2005
- 21) Mizuguchi, H. et al. : Hum. Gene Ther. 9 : 2577-2583, 1998
- 22) Mizuguchi, H. et al. : Hum. Gene Ther. 10 : 2013-2017, 1999
- 23) Mizuguchi, H. et al. : Cancer Gene Ther. 9 : 236-242, 2002
- 24) Mukai, E. et al. : J. Cont. Rel. in press
- 25) Sakurai, F. et al. : Gene Ther. 13 : 1118-1126, 2006



水口裕之 (Hiroyuki Mizuguchi)

独立行政法人医薬基盤研究所基盤研究部遺伝子導入制御プロジェクトプロジェクトリーダー。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）。1996年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年同研究所遺伝子細胞医薬部主任研究官。2005年より現職。2005年より大阪大学大学院薬学研究科招聘助教授。ベクター開発研究を軸に、遺伝子治療学、再生医療（幹細胞生物学や細胞治療）、免疫学、ウイルス学、分子生物学などとの境界領域の研究を展開中。筆者らと共にこの最も重要でチャレンジングな研究に参画してくれる熱意ある大学院生（修士・博士：大阪大学連携大学院）を募集中であり、気軽にお問い合わせ下さい。研究室 HP (<http://www.nibio.go.jp/Proj3HP/index.html>)。