

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) Tompers DM, Labosky PA: Electroporation of murine embryonic stem cells: a step-by-step guide. *Stem Cells* 22: 243-249, 2004.
- 20) Cherry SR, Binischkiewicz 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, Wulfrat 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。

櫻井文毅 (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