

## 第6節 非ウイルスベクター

### 1. 非ウイルスベクターの安全性

#### 1.1 ウイルス性ベクターによる副作用

遺伝子医薬(遺伝子治療薬, 核酸医薬)は, 抗体医薬に匹敵する次世代のバイオ医薬になると期待されており, 現在のところ世界で1309件の臨床試験が進められている<sup>1)</sup>。遺伝子医薬は, 分泌タンパクや細胞表面のタンパクに対して作用する抗体医薬と異なり, 基本的に治療対象となる細胞内で作用するが, 分子サイズが大きいことから吸収効率は低く, 筋肉内注射など特殊な組織を除いて専用のデリバリーシステム(ベクター)が必要である。そのため, 世界中で安全かつ高性能なベクター開発を目指して, 種々のウイルス性または非ウイルス性のベクター開発が進められている状況である<sup>2)</sup>。

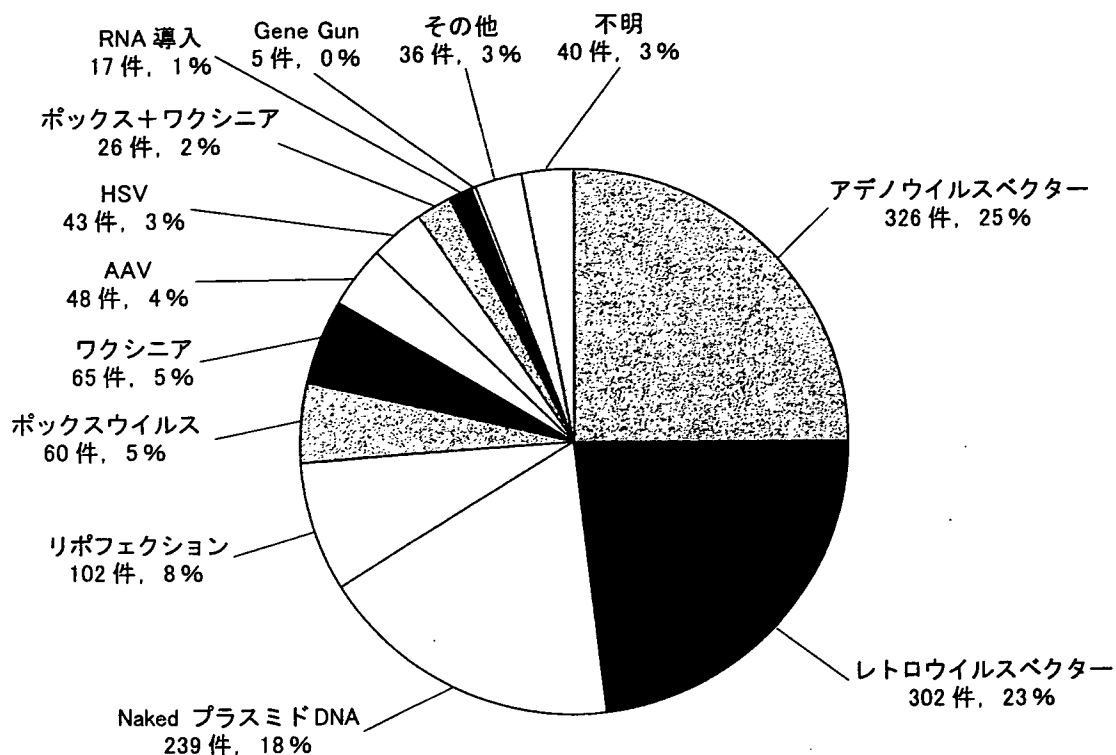
1990年に米国で先天的な免疫不全症であるADA欠損症の患者を対象にした初の遺伝子治療がレトロウイルスベクターで実施されて以来, 遺伝子治療の有効性を拡大するために種々のデリバリーシステム(ベクター)が開発されてきた。従来主流となってきたのはウイルスを改変してベクターとするウイルス性ベクターで, アデノウイルス, レトロウイルス, アデノ伴性ウイルス(AAV)などをベースとしたベクターが臨床試験に使用され, 2003年10月に中国において癌を治療対象としたアデノウイルスベクターがShenzhen SiBiono GeneTech社により上市されている(商品名: Genticine)<sup>3)</sup>。

しかし, アデノウイルスベクターに関しては

1999年にペンシルバニア大学のWilsonらにより実施されていた先天性代謝疾患(OTC欠損症)の臨床試験で, 大量のアデノウイルスを肝動脈から全身投与した18歳の男性患者が, 肝臓障害で死亡する事故が起こり, 遺伝子治療で初の死亡例として報告されて以来, 安全性に関する見直しが行われている<sup>4)</sup>。また, 従来安全性が高いといわれていたレトロウイルスベクターについても, フランスで1999年からX連鎖重症複合免疫不全症(X-SCID)に対して実施された遺伝子治療の患者11人に関して, 2002年から2003年にかけて3人に有害事象(白血病様の症状)が報告されたため, X-SCIDの遺伝子治療が一時凍結状態になった<sup>5)</sup>。このように, 従来安全とされていたウイルスベクターについても, 症例が増加するに従って有害事象が報告されるようになり, 安全性に関して慎重な検討を行う必要がでてきている。そのため, 遺伝子治療用ベクターとして, より安全性の高い非ウイルスベクターの開発が切望されている。

#### 1.2 非ウイルスベクターの課題

ウイルスベクターを使用せずに遺伝子を導入する方法としては, 主にプラスミドDNAが使用され, Gene Gun, 筋肉内注射, リポソームなどの導入技術を利用して臨床開発が行われている。それらの非ウイルスベクターに関する臨床開発の件数は, 遺伝子治療全体の件数(1309件)に対して26.4%(346件)を占めている<sup>1)</sup>(図1)。この数値は, アデノウイルスベクター(326件)や, レトロウイルスベクター(302件)を上回る数値であり, ウイルスベクターと比較して安全性の面で優位性



出典：The Journal of Gene Medicine 誌の Clinical Trial site ホームページより抜粋  
 (http://www.wiley.co.uk/genmed/clinical/)

図1 遺伝子治療の臨床応用の状況

がある非ウイルスベクターに対する期待の高さを反映した数字となっている<sup>1)</sup>。また、アンチセンス、デコイ、siRNA など合成核酸医薬により遺伝子の異常発現を制御するケースもあり、17 件の臨床開発が進められている<sup>1)</sup>。

遺伝子医薬用のデリバリーシステム(ベクター)として開発が期待されている非ウイルスベクターであるが、その第一の課題は導入効率の向上である。細胞のレセプターを介して遺伝子導入が起こるウイルス性ベクターの場合は導入効率が非常に高く、特に生体内においてはその差が顕著である。一方で、非ウイルスベクターに関してはプラスミドDNAの筋肉内注射のように特殊な例を除いて、一般的にウイルスベクターと比較して導入技術が低いことが解決すべき課題となっている。第二の課題は、製剤化・製造技術の確立である。遺伝子医薬の場合は、薬効成分である遺伝子

や核酸医薬に関しても通常の低分子化合物とは異なる規格設定が必要になる上に、非ウイルスベクターではさらにベクター部分に関する製造技術、製剤化技術が必要になるため、より複雑な工程や規格設定が必要になる。そして、第三の課題は安全性の向上である。上記のように非ウイルスベクターでは導入効率の向上が課題となっているが、生体内での導入効率が向上すれば安全性の確保についても考慮すべき点が増えると予測される。特に、遺伝子医薬の場合には生殖細胞への影響についてはもちろん、他の組織や臓器への影響についても慎重に検討を行う必要がある。

## 2. HVJをベースとした非ウイルスベクターの開発

### 2.1 HVJによるデリバリーシステムの開発経緯

HVJ(hemagglutinating virus of Japan ; 別名センダイウイルス)は、1950年頃に東北大学で発見されたパラミキソウイルス科のパラミキソウイルス属のウイルスである<sup>6)</sup>(図2)。マウスを自然宿主とするパラインフルエンザウイルスで、一本鎖のマイナス鎖RNAを遺伝子としており、細胞へ感染後は細胞質で増殖することが明らかとなっている。感染性ウイルスの産生には、特異的なプロテアーゼによるプロセッシングが必要であるが、げっ歯類と霊長類との間でプロテアーゼに種差が

あるためにヒトに対しては病原性がないことが明らかとなっている<sup>7)</sup>。HVJのユニークな点は、体細胞間の融合(膜融合による細胞融合)を起こす活性があることで、この現象は1957年に大阪大学・微生物病研究所の岡田善雄博士により発見された<sup>8)</sup>。そのような性質は、今日のバイオテクノロジーやバイオ医薬を開発する上での基盤技術となっており、実際に抗体医薬の開発に必要なモノクローナル抗体作製技術や、ゲノムプロジェクトに必要なゲノム地図の作製技術の確立に繋がっている<sup>9)</sup>。

細胞融合活性には、HVJの外膜上にあるHNタンパクとFタンパクが関与しており、HNタンパクを介して標的細胞のレセプター分子であるacetyl型のシアル酸を持つ糖鎖と結合し、Fタンパク(F1タンパク)のアミノ末端に存在する疎水性ペプチド部分を介して膜融合が起こることが示

- マウスのウイルスとして1950年代に国内で発見。ヒトへの病原性なし。
- 東北大学で発見されたため別名センダイウイルスと呼ばれる。
- ウイルス粒子直径：150~600ナノメートル(平均300ナノメートル)。
- ウイルス外膜の2種の糖タンパク(Fタンパク質とHNタンパク質)が存在。
- 細胞の食作用ではなく、膜融合により直接細胞質へ侵入する。

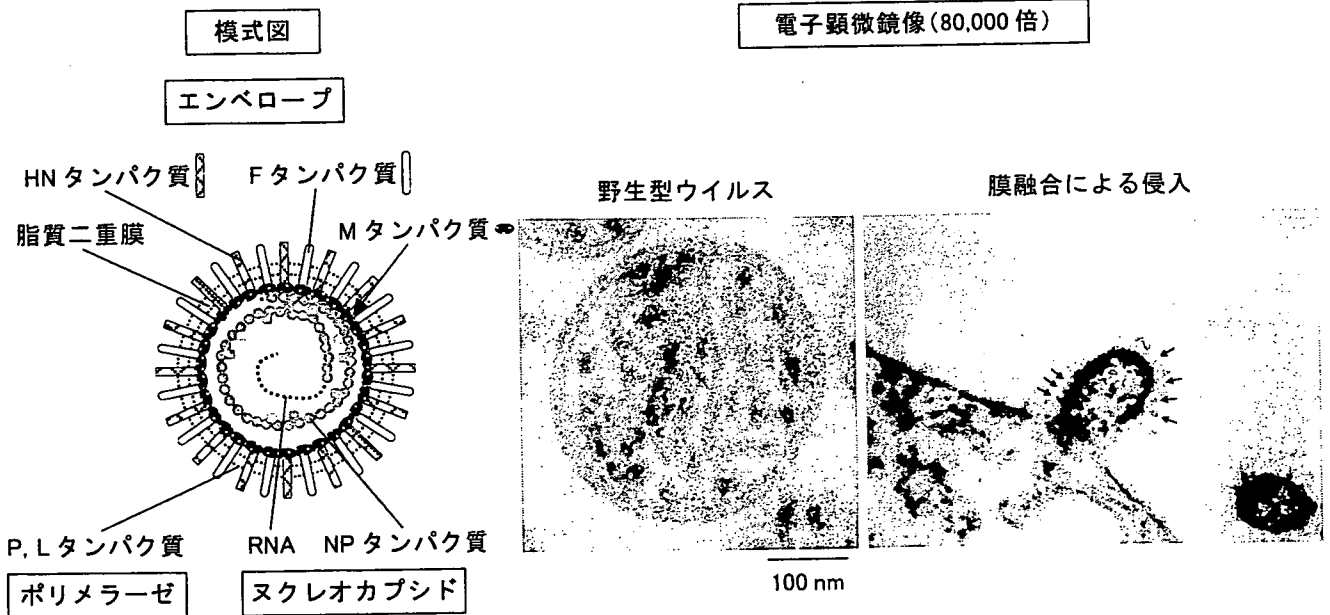


図2 HVJ(Hemagglutinating Virus of Japan)の概要

唆されている<sup>10)</sup>。レセプターである acetyl 型のシアル酸は、脊椎動物の糖タンパク質、糖脂質の糖鎖中に広範に存在することが明らかとなっており、異種間を含めて種々の動物細胞に対して融合活性があることが明らかとなっている<sup>11)</sup>。

このような膜融合活性を利用して、細胞内に高分子物質を導入するためのデリバリーシステムを開発する試みは 1970 年代から開始されており、赤血球ゴースト法、HVJ-リポソーム法、組換え型センダイウイルスベクター、HVJ-エンベロープベクターなどのドラッグデリバリーシステムや遺伝子治療用ベクターが開発されてきた<sup>12)</sup>。

## 2.2 HVJ-リポソームの開発

HVJ-リポソーム法は、大阪大学の金田安史教授により発明されたベクターシステムである<sup>13)</sup>。このベクターシステムは、不活性化処理を行った HVJ とリポソームを融合させて調製するハイブリッド型ベクターである(図 3)。薬効成分となる物質をリポソーム中に高効率に封入させた後に、不活性化 HVJ 粒子との融合を行うことにより、HVJ の特徴である膜融合による物質導入能を付加するため、通常のリポソームよりも導入効率が大幅に増強されている。また、通常のリポソームの場合には、エンドサイトーシスを介して封入物質の導入が起こるのに対して、HVJ-リポソームでは膜融合により直接細胞質内に導入することができる。そのため、導入された物質がエンドソーム内で細胞内酵素や pH の変化により分解されるのを回避することができる。

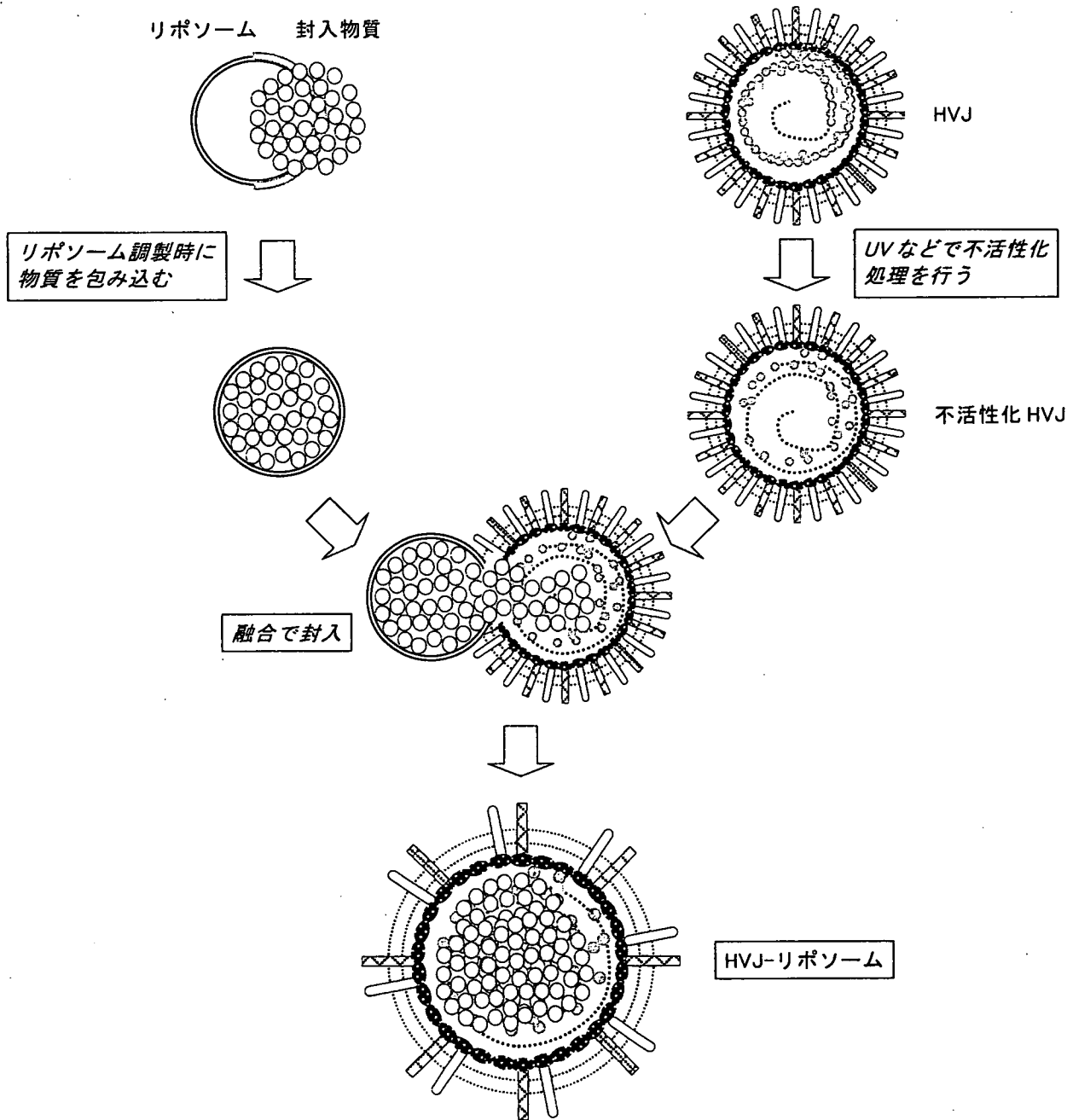
このように、HVJ-リポソーム法はウイルスの持つ導入メカニズムを利用しながら、リポソームの持つ高効率の封入率や安全性を持つユニークなベクターシステムである。実際、動物での種々の評価で導入効率が高いことが報告されている上に、サルを用いた安全性の検討も実施されていることから<sup>14)</sup>、遺伝子治療用のベクターとして実用化

が期待されている。しかし、現在のところベクターの調製が煩雑であること、大量生産が困難であること、均質性や品質の保証が難しいことなどの理由から臨床応用はなされていない状況である。

一方、HVJ のゲノムを改変することで調製する組換えセンダイウイルスベクターも国内の企業により開発されており<sup>15)</sup>、目的のタンパク質の高効率生産に適したベクターとして、遺伝子治療用ベクターとして臨床応用が試みられている。しかし、感染細胞内で抗原性の高いウイルスタンパク質(NP タンパク質)が産生されるため、安全性確保の面で注意が必要である上、遺伝子以外の先端医薬品のデリバリーシステムとしては利用できないため、汎用性の高いシステムとして開発するためには解決すべき課題も多いと考えられる。

## 2.3 HVJ-エンベロープベクターの開発

HVJ-エンベロープベクターは、HVJ-リポソーム法のコンセプトをベースにして、臨床応用のために開発されたベクターで、2001 年に大阪大学の金田安史教授により発明された<sup>16)</sup>(特許公開番号 WO01/57204, USA(US6,913,923 B2), Australia(769385)で既に特許成立)。このベクターシステムでは、HVJ のゲノムを紫外線照射やアルキル化剤などにより破壊して、HVJ 粒子の外膜部分をデリバリーシステムとして利用する(図 4)。HVJ-リポソームと同様に HVJ の持つ高い導入効率を利用している上、HVJ-リポソームと異なってエンベロープ部分をリポソームと融合せずにそのままデリバリーシステムとして利用するため、HVJ-リポソームよりもさらに高効率の導入が期待できる。目的とする薬効成分の封入は、界面活性剤を使用しており、遺伝子(プラスミド DNA)、核酸医薬(デコイ核酸, siRNA)、タンパク質(酵素, 抗体)、合成医薬品(抗癌剤)など、広範な医薬品を封入してドラッグデリバリーシステムとして使用することができる<sup>17)</sup>。封入条件を工夫す



1. リポソームへ目的とする医薬品を封入した後に不活性化処理を行ったHVJと融合させて調製
2. 粒子のサイズはHVJよりも大きくなり、膜融合による導入のためのFタンパク・HNタンパク密度は低下

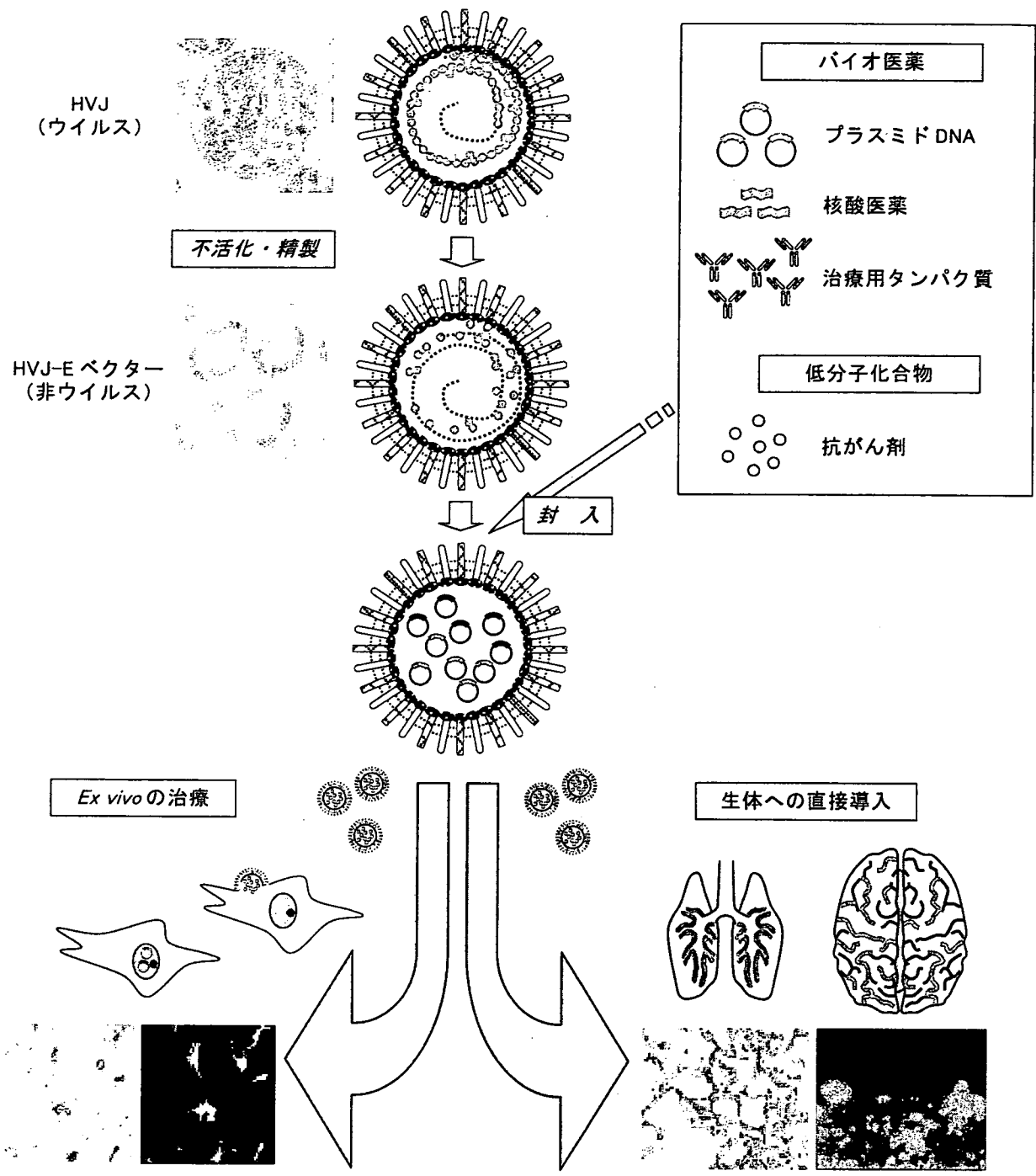
図3 HVJ-リポソームの基本原理

ることにより、HVJの持つ膜融合活性は保持されるため、封入された薬効成分は、標的となる細胞に対して付着後数秒以内に導入される(図5A)。また、免疫系の細胞や初代培養細胞に導入できるため *ex vivo* の治療用に開発できる上、動物の腫瘍組織や臓器に対しても導入できるため遺伝子治

療用ベクターとして汎用的に使用することができる(遺伝子導入試薬としては、石原産業(株)より「GenomONE」の商品名で販売中：[www.iskweb.co.jp/hvj-e](http://www.iskweb.co.jp/hvj-e))。

このようにHVJ-エンベロープベクターは、HVJの持つ効率の高い導入メカニズムを利用して

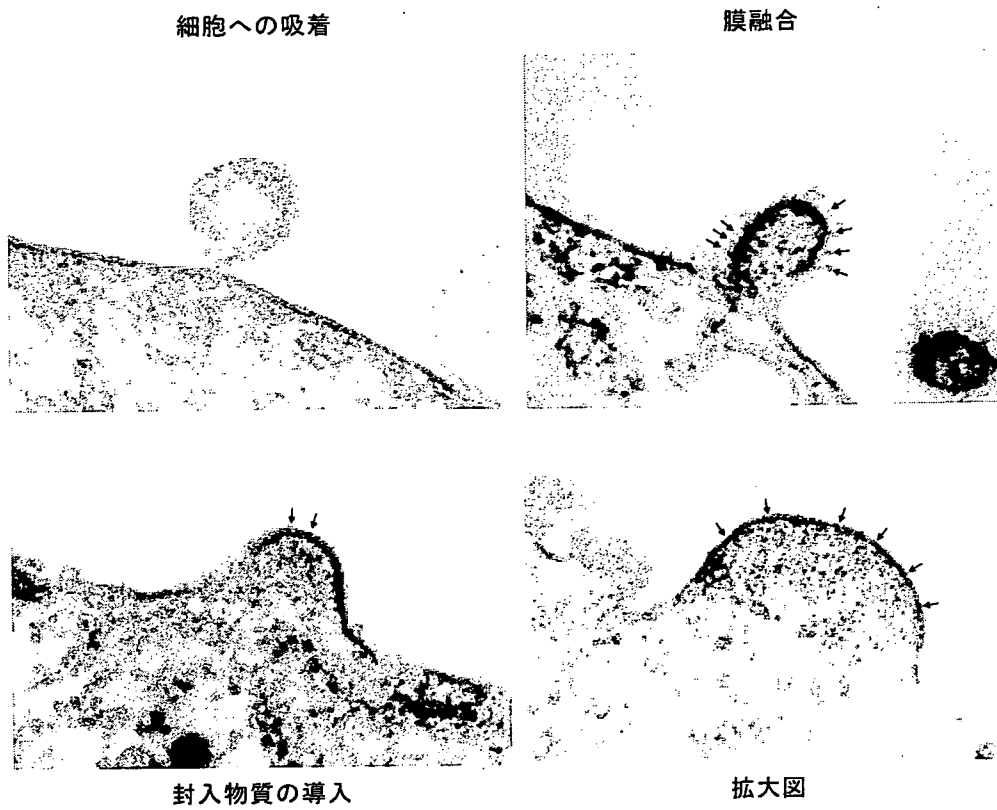
1. 高効率な遺伝子導入が可能(60-70%)
2. 培養細胞と生体臓器の両方へ遺伝子導入が可能
3. 高い安全性(非ウイルスベクターシステム)
4. 迅速な遺伝子導入が可能(膜融合)
5. オリゴ核酸, タンパク質など遺伝子以外の導入も可能



1. 不活性化した HVJ 粒子を界面活性剤処理後に, 目的とする医薬品を直接封入
2. 粒子のサイズは HVJ と同レベルで, 膜融合による導入のための F タンパク・HN タンパク密度は保持

図 4 HVJ-エンベロープベクターの特徴

A. 膜融合による導入の電子顕微鏡写真



B. リポフェクションとの比較

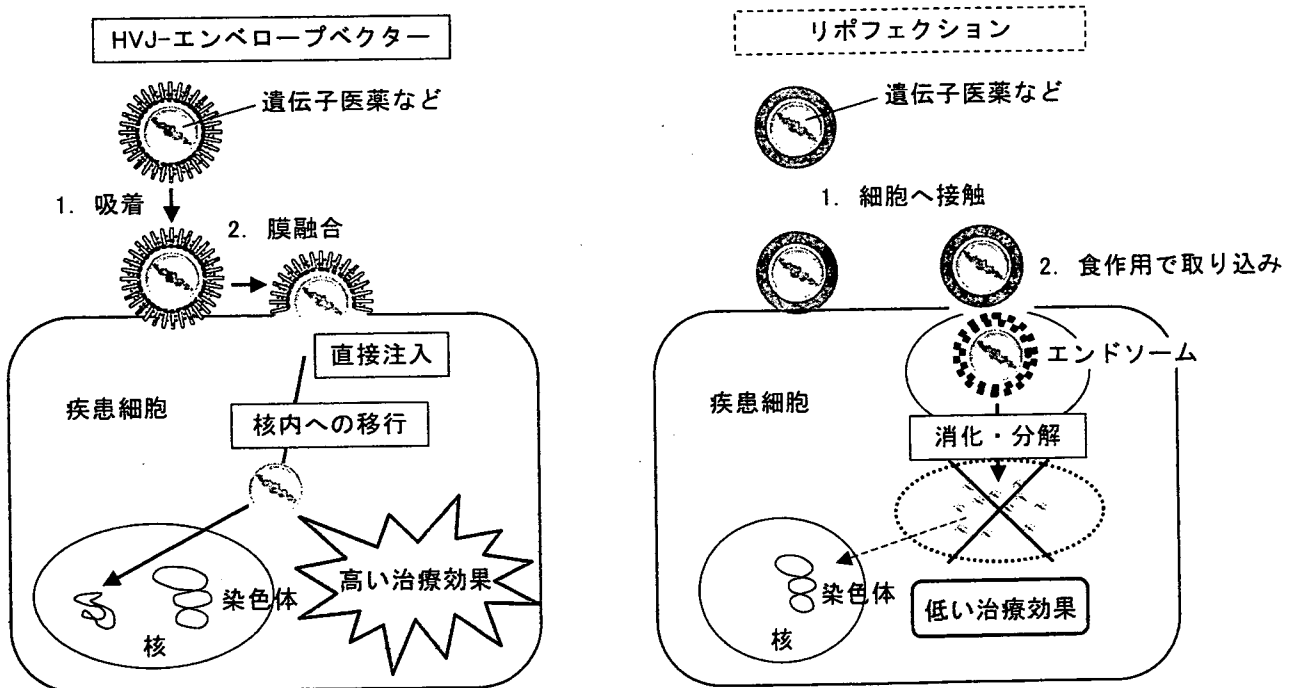


図5 膜融合による(HVJ-エンベロープベクター)導入の優位性

いながら、そのウイルスとしての性質については不活性化を行い、外膜部分のみをナノカプセルとして利用するため、位置付けとしては非ウイルス性の高性能ベクター(ドラッグデリバリーシステム)になると考えている。

## 2.4 HVJ-エンベロープベクターの特徴

HVJ-エンベロープベクターは、このように国内で開発が進められているユニークなデリバリーシステムである。そこで、その特徴について簡単に述べることにする。

第一の特徴は、ユニークな導入のメカニズムである。HVJ-エンベロープベクターにおいても膜融合により封入医薬品が直接標的細胞の細胞質に導入されるため、効率の高いデリバリーが可能である。その理由は、上記のようなエンドサイトーシスを介さないためであり、例えば核酸医薬を用いた検討では、正電荷リポソームで導入した場合には70%の核酸医薬の分解が認められたのに対して、HVJ-エンベロープベクターでは15%しか分解が認められなかったことが報告されている<sup>18)</sup>(図5B)。遺伝子医薬は製造原価が高額であることから、デリバリーされるまでに分解される比率を低減することは、医薬品として開発した場合のコストを考慮する上で重要な要因である。

第二の特徴は、広範な生体臓器や組織に対して低侵襲で高効率に導入できる点である。これまでに、動物試験においては脳神経組織、癌組織、筋組織、子宮、肝臓、心臓、肺、眼、脾臓、関節組織などに対して遺伝子医薬の導入が可能であることが明らかとなっている<sup>12)</sup>。そして、HGF 遺伝子をHVJ-エンベロープベクターに封入してラットの脳脊髄液内に注入することにより、延髄や小脳の神経細胞とグリア細胞、内耳の神経節細胞まで遺伝子導入が認められ、脳梗塞や難聴の予防と治療が可能であることが示唆されている<sup>19), 20)</sup>。また、Rad51 に対する核酸医薬 siRNA をHVJ-

エンベロープベクターに封入して皮下に形成された癌組織に導入することにより、約50%の効率で細胞内導入することができ、シスプラチンの腫瘍抑制効果を10倍以上増強することも明らかになっている<sup>21)</sup>。さらに、抗原遺伝子とサイトカインを産生する遺伝子をHVJ-エンベロープベクターに封入して、DNA ワクチンとして筋肉内に導入することにより、感染症に対するワクチン効果と治療効果が認められることも明らかとなっている<sup>22), 23)</sup>。このように、動物の疾患モデルにおいて、実際に治療効果が認められるレベルの高い導入効率を持つことが明らかとなっている。さらに、導入効率が高いにも関わらず侵襲性が低いことも特徴である。例えば、心筋細胞に対して正電荷リポソームとHVJ-エンベロープベクターのそれぞれを用いて遺伝子を導入してLDHの放出を指標にして評価を行った実験では、正電荷リポソームではLDHの濃度が増加するのに対して、HVJ-エンベロープベクターの場合にはコントロールである無処理群と同レベルの濃度しか認められていない<sup>24)</sup>。そのため、治療薬として連続投与を行う場合に問題となる投与部位の炎症反応も低レベルであり、マウスを用いた実験では連続投与が可能であることが明らかとなっている<sup>25)</sup>。

第三の特徴は、治療に有効な免疫系を誘導することができる点である。詳細なメカニズムの解析については現在解析中であるが、癌細胞に対する免疫や、ウイルスや結核感染症の予防と治療に有効なTh1タイプの免疫を誘導できること、そして成立した免疫が長期間持続することが明らかとなっている。このような性質は、癌や感染症に対する特異的な免疫の活性化に有効であり、免疫療法剤としての開発が有望であることを示唆している。

## 2.5 HVJ-エンベロープベクターの臨床応用

HVJ-エンベロープベクターを医薬品として開発するためには、1) その特徴を活かした臨床ブ



プログラムの選択と薬効データの取得, 2) 医薬品レベルの安全性データの取得, 3) 医薬品レベルの製造技術・製造設備の整備の3項目が必要になる。安全性と製造に関しては後述するので, ここでは臨床プログラムについて記述する。前項で述べたように, HVJ-エンベロープベクターの特徴は, 低侵襲性で効率の高い導入が可能であることと, 生体防御に必要な免疫を効率よく活性化できることである。このような特徴を活かして, 難治性疾患の治療薬を開発するのに適したプログラムとして, 癌に対する免疫療法と, 感染症に対する治療薬・ワクチンを選択し, 以下のように非臨床プログラムを進めている。

癌に対する免疫療法は, HVJ-エンベロープベクターに抗癌剤, 核酸医薬, 遺伝子を HVJ-エンベロープベクターに封入して局所の腫瘍組織に直接投与する治療法と<sup>21), 26), 27)</sup>, 癌免疫に重要な樹状細胞に対して *ex vivo* で HVJ-エンベロープベクターを利用して癌抗原遺伝子を導入して体内に移植する治療法<sup>12)</sup> の2種類のプロトコルを想定している。抗癌剤としてはブレオマイシンが有効である他, アドリアマイシンやシスプラチンとの併用でも効果があることが明らかとなっている<sup>21), 26)</sup>。核酸医薬としては, 抗癌剤に対する抵抗性に関与する Rad51 遺伝子に対する siRNA を HVJ-エンベロープベクターに封入して投与すると, その発現を抑制することで抗癌剤の効果を増強できることが明らかになっている<sup>21)</sup>。また, 遺伝子については, 癌抗原とサイトカイン遺伝子などを組み合わせて HVJ-エンベロープベクターに封入して投与を行うことで, 癌に対する DNA ワクチンとして使用することを想定している<sup>27)</sup>。いずれの場合でも, HVJ-エンベロープベクターを使用することで, 癌細胞に対する免疫が誘導され, 再発や転移を防止することで治療効果を向上できると考えている。また, 癌免疫療法では, 誘導された免疫の効果が長期間持続しないことが問題となっているが, HVJ-エンベロープベクターを用いて動

物レベルで治療を行った場合には, 長期持続型の癌細胞特異的な免疫が誘導されることが示唆されている。

感染症に対する DNA ワクチンは, 結核感染症をモデルとして開発を進めている。治療薬としては結核の構成タンパク質である HSP65 遺伝子と, 免疫を活性化する IL-12 遺伝子を HVJ-エンベロープベクターに封入して使用する。そして, 筋組織に投与を行って目的の遺伝子を発現することで, 結核菌に対する免疫を誘導する。癌に対する免疫療法の場合と同様に, 結核感染症に対する治療では Th1 タイプの免疫が誘導されることが重要であり, 種々の動物モデルを用いた試験で良好な結果が得られている。特に, 結核の疾患モデルとしてはサルを用いた薬効試験が最もヒトに近い病態であることが示唆されているが, HVJ-リポソームを用いた評価試験で良好な結果が得られており<sup>22)</sup>, WHO などの国際的機関からも高い評価を得ている。さらに, エイズなどウイルス感染症においても, 同様に免疫を活性化することが重要であり, 他の感染症への適応拡大についても期待している。

### 3. HVJ-エンベロープベクターの非臨床安全性試験

#### 3.1 臨床試験に移行するまでに検討しておくべきこと

HVJ-エンベロープベクターは, 1) 新規性が高いために過去の使用経験・情報の蓄積が少なく, リスクの予測が難しい「細胞・組織を利用した医薬品」に該当し, 2) ウイルス由来の「細胞・組織」を用いることから, ウイルスを不活性化して利用しているとはいえ感染性因子混入のリスクがつきまとう。これらのことから治験を開始するために製品の品質と安全性を確認するために実施される確認申請<sup>28), 29)</sup>が必要になると考えられる。

表1 HVJ-エンベロープベクターの安全性試験

投与経路		投与量	試験結果
単回投与			
マウス	静脈内	0, 1,350, 2,970, 4,590, 6,210, 7,830 および9,450 HAU/匹	概略の致死量(HAU/匹) ♂: 7,830, ♀: 9,450
マウス	鼻腔内	0, 913, 1,825 および 3,650 HAU/匹	概略の致死量(HAU/匹) ♂♀: >3,650
カニクイザル	静脈内	0, 66,666 HAU/匹	無毒性量(HAU/匹) ♂: >66,666
反復投与			
マウス	皮内	0, 10, 100, 1,000, 10,000, 100,000 HAU/匹を週1回計2回投与	一般状態, 体重に異常なし, 2回目投与でアナフィラキシー症状なし。 投与部位皮膚に炎症性病変, 10,000 HAU以上で真皮の壊死, 膿瘍形成, 潰瘍形成, 皮下膿瘍
カニクイザル	筋肉内	HVJ-エンベロープ未封入りポソーム懸濁液(リポソーム 40,000 HAU/匹) HVJ-エンベロープリポソーム懸濁液(400μgのpUC-SRα/HGFを封入したリポソーム 40,000 HAU/匹)	死亡なし。一般状態, 血液検査, 血液生化学検査で異常なし。 解剖, 病理組織学的検査で異常なし。

確認申請において承認を得るためには、関連する法令、通知、指針に示された項目に準拠してデータを取得する必要がある他に、ICH品質ガイドラインについても考慮を行って、必要なデータの取得を行う必要がある。データが必要な項目としては、1) 起源または発見の経緯および外国における使用状況、2) 製造方法の概要(原材料に関するデータも含む製造工程)、3) 品質管理、4) 安定性、5) 非臨床試験(安全性試験、効力または性能を裏付ける試験、体内動態)、6) 非臨床試験などの内容の総括、7) 細胞・組織利用医薬品または医療用具の製造施設および設備、8) 備考の8項目が設定されており、それぞれについてデータを整備して、医薬品として開発する妥当性を説明しなければならない。筆者らは、臨床試験に移行するために、前項で述べたように項目5)の非臨床試験を実施中である。また、それと並行して2)、3)、4)、7)に関連するデータを取得するために治験薬製造施設の整備も含めた製造技術の開発も進めている。ここでは表1に示したように今までに得ら

れたデータについて以下にその概略を記載する。

### 3.2 単回、静脈内投与、マウス

HVJ-エンベロープベクターを0(対照)、1,350, 2,970, 4,590, 6,210, 7,830 および9,450 HAU/匹の用量で雌雄各群5匹のマウスに単回静脈内投与した。概略の致死量は雄では7,830 HAU/匹、雌では9,450 HAU/匹であった。

死亡例の一般状態は自発運動の減少、横臥位、伏臥位、強直性痙攣、吐血、呼吸困難、鼻周囲および四肢の皮膚色の異常(暗赤色化)、皮膚の蒼白化、流涙および体温低下であった。剖検では、赤色鼻汗痕、肺の赤色巣および赤色化が、病理組織学的検査では肺うっ血、血管周囲性出血、水腫、限局性肺泡出血および肺泡単核細胞浸潤が認められた。

生存例の一般状態は4,590 HAU群以上では、自発運動の減少、尾尖端部の黒色化、脱落あるいは壊死がみられた。剖検では、尾尖端部の黒色化、

壊死，尾の痂皮形成あるいは尾の表皮剥離などが認められ，2,970 HAU 以下の群では，一般状態および剖検に異常はなかった。血液生化学検査では，9,450 および 7,830 HAU 群の雄で，LDH の高値および A/G 比の低値がみられた。

9,450 HAU 群の生存例の病理組織学的検査では，投与部位皮下組織の浮腫，炎症，壊死，筋線維の再生，腎臓の尿細管好塩基性変化，細胞円柱，硝子円柱，メサンギウム細胞の増加，肺の血管周囲性単核細胞浸潤，限局性肺泡出血および肺泡単核細胞浸潤がみられた。1,350 HAU 以上の群の投与部位，腎臓あるいは肺でも同様の所見が認められたが，頻度は投与量の減少に伴い低下した。

### 3.3 単回，鼻腔内投与，マウス

HVJ-エンベロープベクターを 0(対照)，913，1,825 および 3,650 HAU/匹の用量で雌雄各群 5 匹のマウスに単回鼻腔内投与した。

死亡はいずれの群でもみられず，一般状態，体重および剖検も異常は認められなかった。病理組織学的検査では，肺の血管周囲性リンパ球浸潤が 913 HAU/匹以上の群で認められた。

### 3.4 反復，皮内投与，マウス

HVJ-エンベロープベクターの 0(生理食塩液，対照)，10，100，1,000，10,000，100,000 HAU/匹を各群 5 匹の雄 8 週齢のマウスに週 1 回計 2 回皮内投与し，その 14 日後に剖検，病理組織学的検査を実施した。

一般状態，体重に異常はなく，2 回目投与でアナフィラキシー症状はみられなかった。剖検では投与部位の皮膚に炎症性病変が認められ，病理組織学的には 10,000 HAU 以上では真皮の壊死，膿瘍形成，潰瘍形成および皮下膿瘍がみられたが，1,000 HAU まではそのような所見はなく，組織障害は軽度であった。

### 3.5 単回，静脈内投与，サル

16 匹の雄カニクイザル(3~5 才，体重 2.8~4.6 kg)を用いて，単回，静脈内投与により HVJ-エンベロープベクターの安全性を検討した。試験には対照群(10 mL の生理食塩液投与，n=4)，溶媒対照群(10 mL の HVJ-エンベロープリポソーム懸濁液投与，50  $\mu$ M 脂質と HVJ-エンベロープベクター 66,666 HAU，n=5)ならびに HVJ-リポソーム群(10 mL の DNA 非存在の HVJ-リポソーム懸濁液投与，50  $\mu$ M 脂質と 666  $\mu$ g の pcDNA3.1(+), HVJ-エンベロープベクター 66,666 HAU，n=7)を設けた。

一般状態，体重，血液検査，血液生化学検査，尿検査は投与前，投与後 1，14，21，28 日目に測定あるいは実施し，観察期間終了後に剖検し，病理組織学的に検査した。その結果，一般状態，体重，血液学的検査，血液生化学検査および尿検査で異常は認められなかった。また，病理組織学的にも異常は認められなかった。pcDNA3.1(+)が PCR 分析の結果，1 日目の全てのサルの肺，肝臓，脾臓，2 匹中 1 匹の腎臓，2 匹中 1 匹の心臓から検出された。しかし，DNA は 14，21，28 日の検査からは検出されなかった。ウイルスゲノム DNA も検出されなかった。

### 3.6 反復，筋肉内投与，サル

4 匹の雌雄カニクイザル(雄 2 匹，雌 2 匹)を用いて，反復，筋肉内投与による HVJ-エンベロープベクターの安全性を検討した<sup>14)</sup>。2 mL の溶媒投与対照群 [HVJ-エンベロープリポソーム懸濁液(30  $\mu$ M の脂質，40,000 HAU)]，pUC-SR $\alpha$ /HGF を封入した HVJ-リポソーム群(30  $\mu$ M 脂質，400  $\mu$ gpUC-SR $\alpha$ /HGF，40,000 HAU)を設けた。

一般状態，血液検査，血液生化学検査および血清 HGF 検査は投与前，投与後 7，21，28，29 日目に実施したが，試験期間中，死亡はなく一般状

態も変化はなかった。血液検査でも顕著な変化はなかった。その他、毒性学的に意義のある変化は認められなかった。pUC-SR $\alpha$ /HGFを投与したサルにHGFの上昇が認められた。解剖および病理組織学的検査で異常所見は認められなかった。

### 3.7 非臨床安全性試験のまとめ

一般的にリポソームは、単球や顆粒球などの網内系細胞内に取り込まれやすいことが知られており<sup>30), 31)</sup>そこで高濃度に分布し、その消失は穏やかであると考えられる。したがって、全身投与された場合、細網内皮系臓器への影響については注意しておく必要がある。また、薬物動態についても非ウイルスベクターは特定の臓器に取り込まれやすいと考えられるため、毒性との関連で十分検討しておく必要があると思われる。

しかし、今まで述べてきた安全性試験から、HVJ-エンベロープベクターの細網内皮系臓器への障害を示唆するような所見は得られていない。

以上、筆者らが実施した薬効モデル動物を使用した試験から得られた薬効量の約10倍量でも重篤な毒性が認められていないことからヒトでも十分な治療域が確保できると考えられた。これらのことから現在、膀胱癌を適応症として臨床試験を準備している。さらに今後、固形がん、感染症領域にも適応を拡大すべく検討している。

## 4. HVJ-エンベロープベクターの製造技術

### 4.1 製造技術の概要

HVJ-エンベロープベクターは、ヒト培養細胞により産生されるバイオ医薬となるため、3項で述べたような確認申請が必要になると考えられる。ここでは、確認申請に必要とされる項目のうち、1) 製造方法の概要(原材料に関するデータも含む

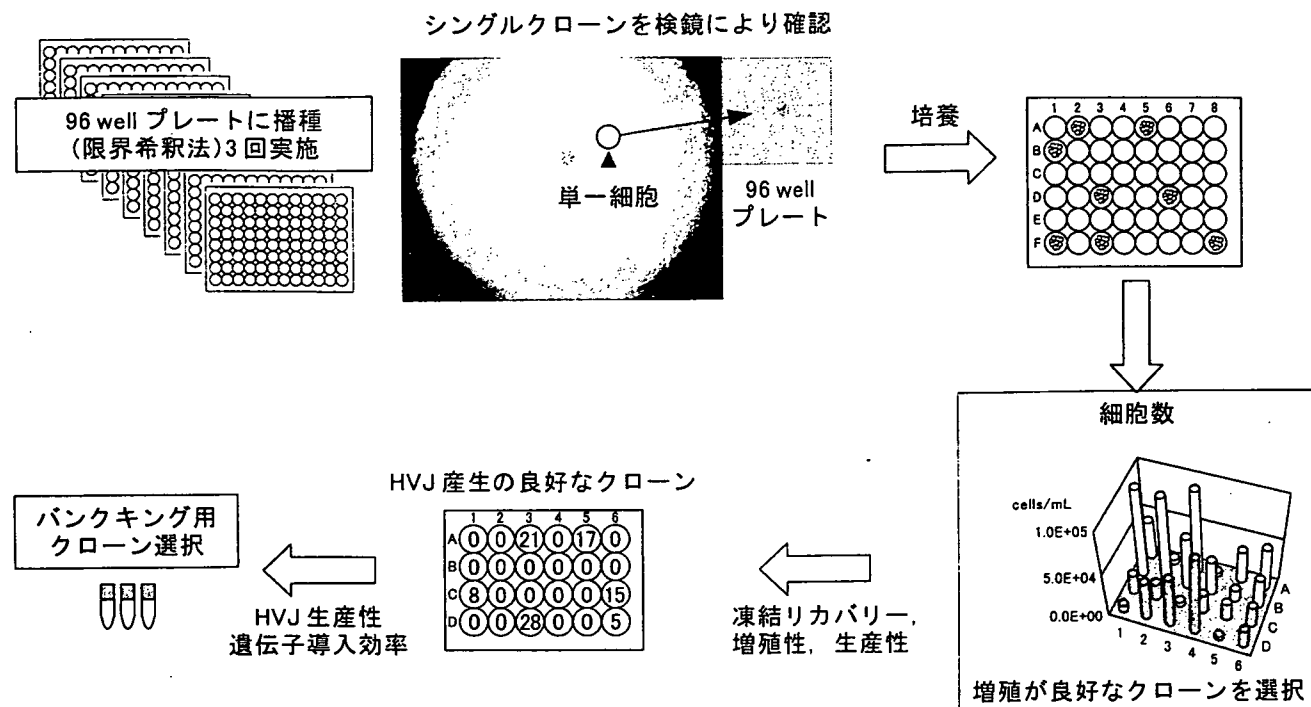
製造工程)、2) 品質管理、3) 安定性、4) 細胞・組織利用医薬品または医療用具の製造施設および設備に関連するデータについて記述する。

### 4.2 製造用材料(マスターバンク)の整備

現在HVJ-エンベロープベクターは、ヒト培養細胞を用いて製造を行っている。したがって、確認申請のためには、製造に使用する細胞の履歴に関する書類を整備した上でマスターセルバンクの作成を行い、ガイドラインに規定されている項目について検査を行う必要がある。筆者らは、製造に用いる予定の細胞とHVJについては、ガイドラインに従ってマスターバンク(マスターセルバンク、マスターウイルスバンク)の整備を行い、確認申請のために準備を行っている。そこで、整備過程も含めて、その概要について記述する。

HVJ-エンベロープベクターを構成する膜成分は基本的に産生細胞の細胞膜となるため、抗原性などの問題を低減することを目的として、ヒト培養細胞株を選択してマスターセルバンクの作成を実施した。バンクを作成するために、細胞のクローニングを実施(顕微鏡下で確実に単一細胞であることを確認)した後に、必要なスケールまで培養を行った。そして、購入からクローニングの過程における原材料の使用履歴、細胞増殖性、継代数、細胞数倍化レベル(PDL)など、必要な履歴についてはデータとして保存した。細胞培養に関しては、動物由来原料を含有しない無血清培養を行って、BSEなど混入を防止するようにした。そして、HVJの産生効率や細胞の増殖速度を指標にしてクローンの選択を行った後に(図6A)、必要なスケールまで拡大培養を行った時点でシードセルストックとして一旦凍結保存して、ウイルスなどの混入や無菌性についてGLP施設で検査を行って品質を確認した。さらに、シードセルストックからGMP準拠の自社施設のクリーンルーム内でマスターセルバンクの作成を行った。作成

A. マスターセルバンクの整備



B. 整備したマスターバンクの保存

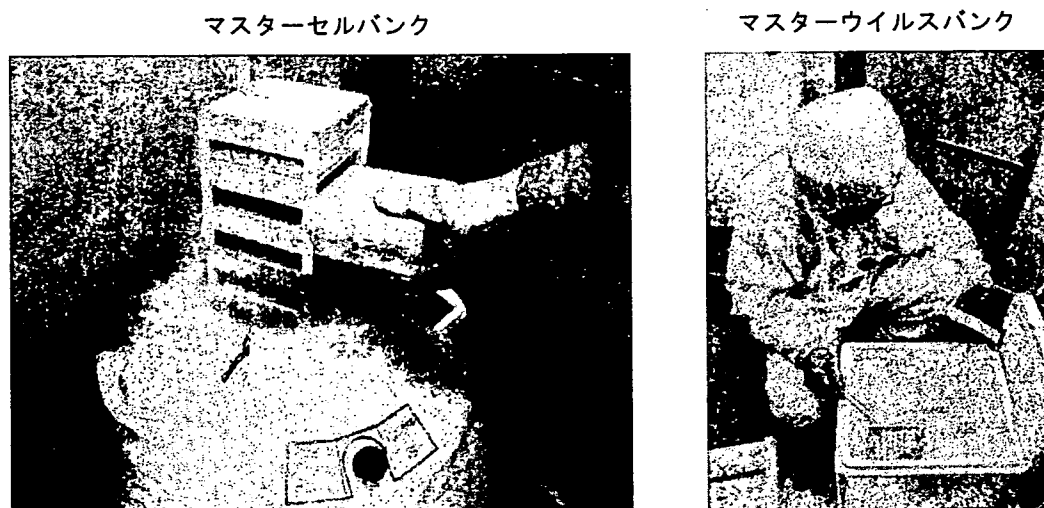


図 6 確認申請に向けたマスターバンクの整備

したマスターセルバンクの品質検査は、ガイドラインに従って検査項目を設定した上、GLP 施設を持つ外部委託機関により無菌性、マイコプラズマ混入否定試験、ウイルス混入否定試験、細胞の純度試験を実施して、それぞれの項目について陰性の結果を得た。作成したマスターセルバンクについては、リスク管理のために自社の製造施設と、

国外の保管管理会社の両施設に分割して保管・管理を行っている(図 6B)。現在、バンクから起眠後製造に使用できる期間の設定を行った上で、CAL 試験(Cell At the Limit)を実施している。

HVJ についても、ATCC より購入後にクローニングを実施して履歴の整備を行った後に、産生効率を指標にしてシードストックを作成した。そ

して、上記のようにして整備を行ったマスターセルバンクを使用して、シードストックから GMP 準拠の自社施設内でマスターウイルスバンクの作成を行った。さらに、マスターセルバンクと同様にガイドラインに従って必要な検査項目の設定を行った上で、GLP 検査機関に委託して品質検査を行った。現在、自社の製造施設において作成したマスターウイルスバンクの保存管理を行っている(図 6B)。

以上のように、バイオ医薬製造に必要なマスターバンク(細胞と HVJ)については自社において整備を行った上で、第三者機関である外部試験委託機関において GLP 品質検査試験を行って必要なデータを取得した上、製造用バンクとして保管管理を行っている。

#### 4.3 バイオリクターシステムによる製造

従来 HVJ-エンベロープベクターは、発育鶏卵を用いて原料の製造を行っていた。この方法は、インターフェロン製造用原料として使用する HVJ を産生する場合に採用されている方法である。また、ワクチン製造用のウイルスを産生する場合にも、同様の方法が採用されてきた。しかし、鶏卵の場合には品質的に季節変動があること、緊急時にニワトリを大量に飼育して迅速に対応することは困難であること、SPF レベルの発育鶏卵を大量に準備することが困難であること、無菌的に粒子を回収することが困難であることが課題であった。そこで、近年ワクチン製造用としては、発育鶏卵ではなく培養細胞を使用したバイオリクターシステムによる無菌製造への切り替えが進められている<sup>32)</sup>。また、HVJ-エンベロープベクターの場合は、産生細胞の細胞膜成分を含むことから、発育鶏卵を製造に使用するとニワトリ由来成分の混入が起るため、治療薬の製造には適当でないと判断された。そこで、ヒト培養細胞を用いたバイオリクターシステムによる製造技術の開発を行っ

た(図 7)。

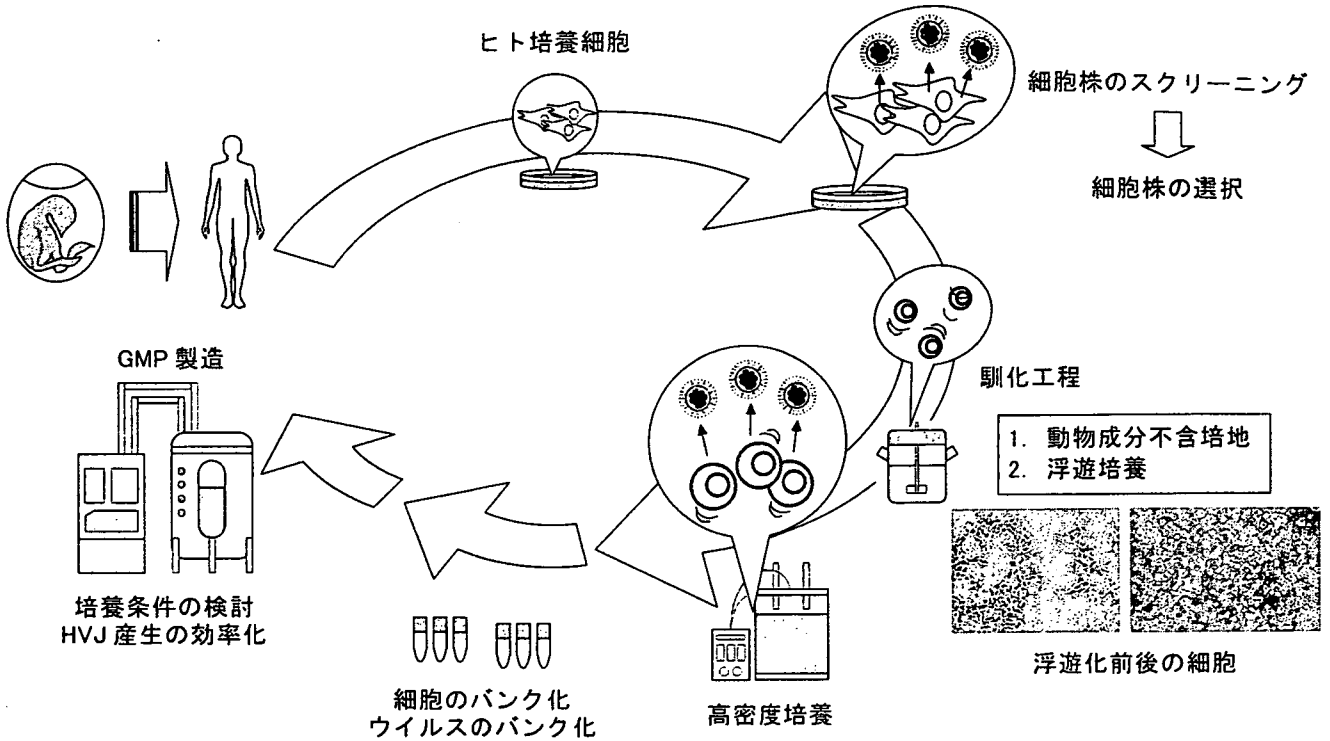
従来、実験室レベルでは培養細胞を用いた HVJ の産生には付着細胞が用いられていたが、産生効率が非常に低レベルであることや、ビーズなどを使用した培養の場合には工業的なスケールアップを行うための工程が複雑になることから、使用する付着細胞を浮遊培養に馴化させた上、高密度培養を行うための条件検討を行った。さらに、種々の培養条件の検討を実施することで発育鶏卵により、製造した場合と同レベル以上の産生効率を得ることに成功している。さらに、BSE 混入の問題を回避するために、動物由来成分を含まない無血清培地中での培養による製造技術を開発している。

バイオリクターシステムに関しても、製造機器メーカーと共同で開発を行い、現在までにスケールアップが可能な無血清培地中で、浮遊培養条件下でバイオリクターシステムによる製造を行っており、上記のように整備したバンクを使用して品質的にも安定した HVJ-エンベロープベクターを供給できる状況である。このように、従来は困難であったヒト培養細胞を用いてスケールアップ可能で医用材料レベルの製造に適合した技術を開発した上で、生産効率的にも従来法である発育鶏卵と同レベル以上の数値を達成している。今後は、治療薬製造に向けて工程のバリデーションを実施していく予定である。

#### 4.4 カラムクロマトグラフィー法による精製

従来、ウイルスベクターやワクチン用ウイルスの製造においては、密度勾配遠心法による精製が一般的であった。しかし、筆者らは工業的なスケールアップに対応することが容易であること、治療薬 GMP グレードの工程開発が可能であること、精製効率の高いこと、欧米での実績などを考慮して、カラムクロマトグラフィー法による精製技術を開発した(図 8)。従来は、エンベロープウイルス粒子は物理的に弱いために精製工程で破壊

A. ベクター製造用細胞の整備の概略



B. ベクター製造工程の概略

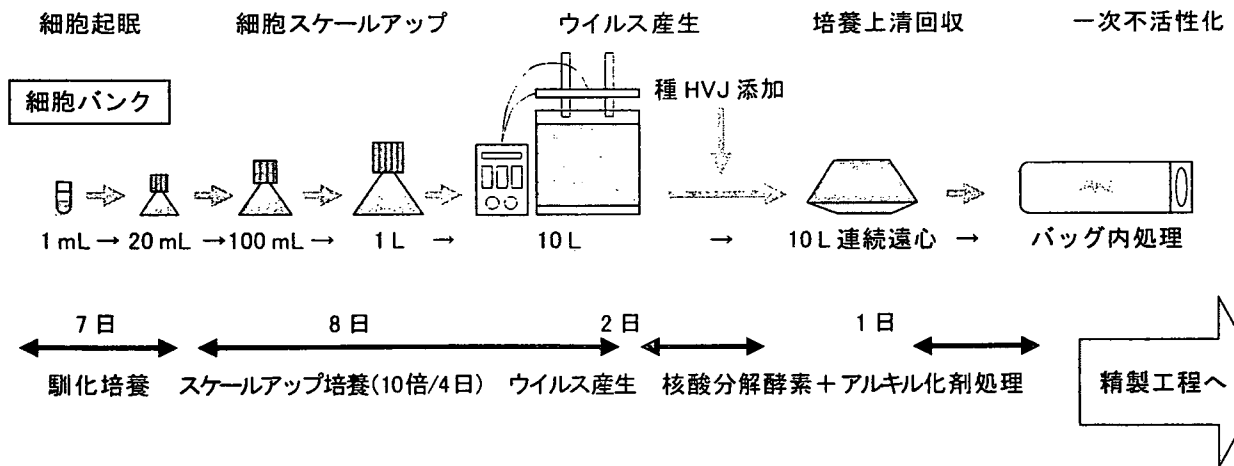


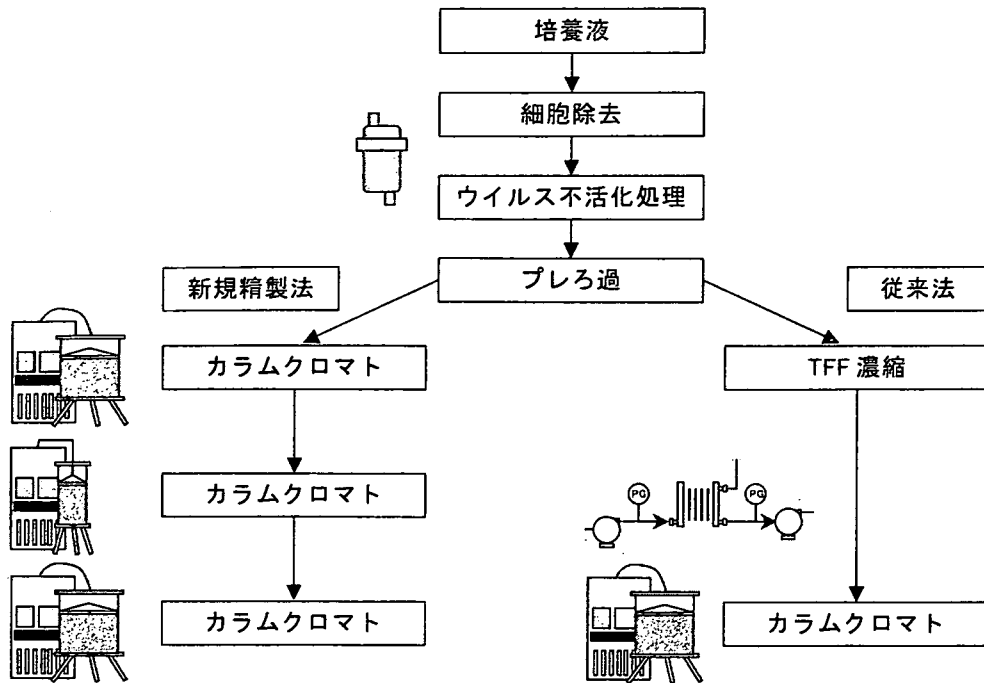
図7 バイオリアクターシステムによるベクターの製造

されてしまうために回収率が悪いと考えられていた上、数百ナノメートルの粒子の場合にはカラムに充填した樹脂のボイド部分を素通りしてしまうために、官能基によるトラップ効率が悪くなることが予測されていたため、カラムクロマトでの精製は困難であると考えられていた。HVJ-エンベロープの膜部分も基本的に細胞膜と同様であり、非常にマイルドな条件で精製工程を構築する必要

があるため、特にせん断力がかかる濃縮工程を省くことを目的として、種々の条件を設定して試行錯誤を行った。その結果、現在までに3段のカラムを組み合わせることで膜濃縮工程を含まない精製工程を構築して、原薬となるHVJ-エンベロープベクターを製造することに成功している。収率の面でも、初期に予測された10%程度という数値を大きく上回る数値を得ており、工業レベルで

A. ベクター精製法の改良

3種類のカラムクロマトグラフィー法の組み合わせにより、従来法で実施していた濃縮工程を除外した。



B. ベクター精製工程の概略

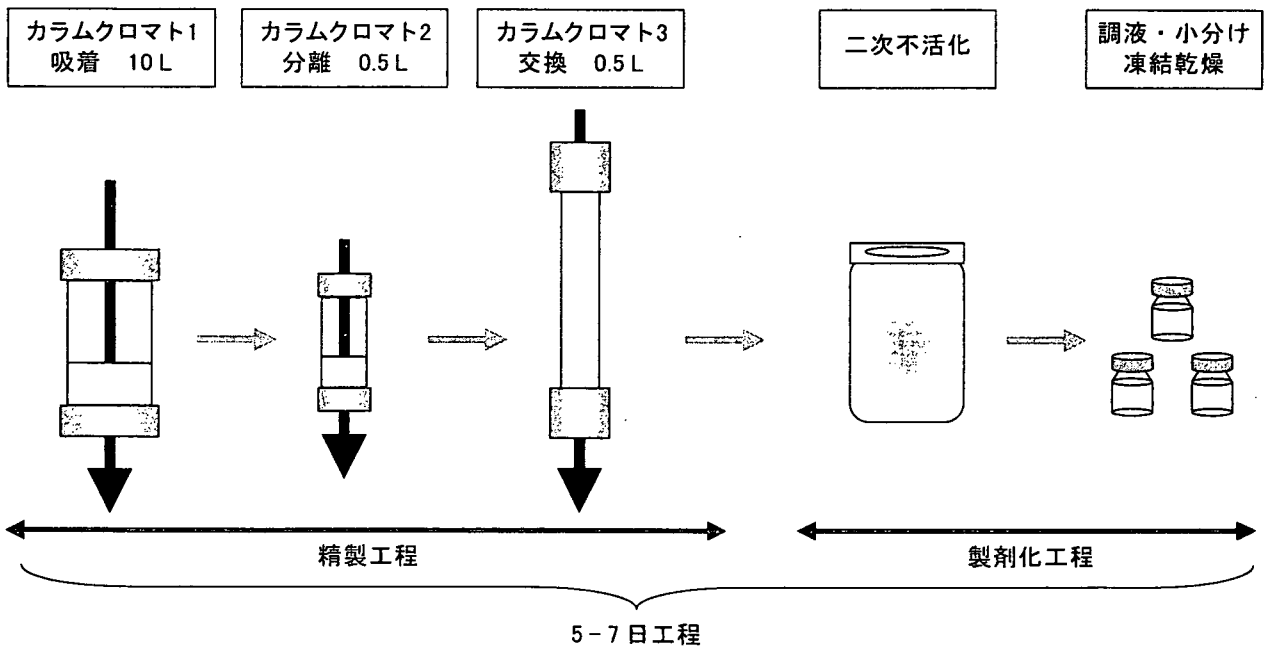


図8 カラムクロマトグラフィー法によるベクターの精製

も十分に通用する工程を構築している。今後、封入する遺伝子医薬の特性を考慮した上で、精製工程の改良とバリデーションの実施を進めていく予定である。



#### 4.5 凍結乾燥法による製剤化

前項でも述べたように、従来エンベロープウイルスやHVJ-エンベロープベクターのように、物理的に弱い脂質二重膜を含む粒子は、限外濾過法やタンジェンシャルフロー濾過法による濃縮や、凍結乾燥は困難であると考えられていた。しかし、当時米国の遺伝子治療企業であるジェネティックセラピー社(Genetic Therapy Inc : GTI)で遺伝子治療用ベクターの製造技術を開発していた小谷らは、レトロウイルスベクターを凍結乾燥法により

失活させることなく濃縮・製剤化できることを報告した<sup>34)</sup>。この技術開発は、脂質二重膜により構成される粒子のように脆弱な構造を持つものであっても、凍結乾燥法による製剤化が可能であることを示す画期的な出来事であった。筆者らの研究所においても、HVJ-エンベロープベクターの最終製剤化には凍結乾燥法を想定して、添加剤の種類や濃度、温度条件など種々の条件検討を行っている。現在までの検討により、凍結乾燥により遺伝子導入活性を保持した状態で製剤化できることが明らかとなっている(図9)。今後はさらに封

##### A. HVJ-エンベロープベクターの凍結乾燥

凍結乾燥中のベクター

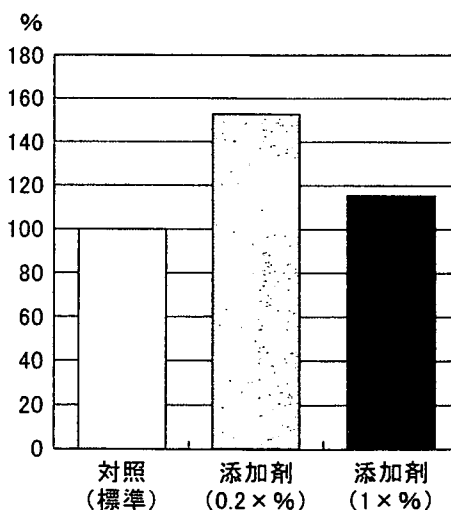


凍結乾燥したベクター



##### B. 凍結乾燥が活性に及ぼす影響の検討

凍結乾燥後に測定した遺伝子導入活性



HVJ-エンベロープベクターは、添加剤や温度条件を検討することで凍結乾燥後も活性を保持させることができる。

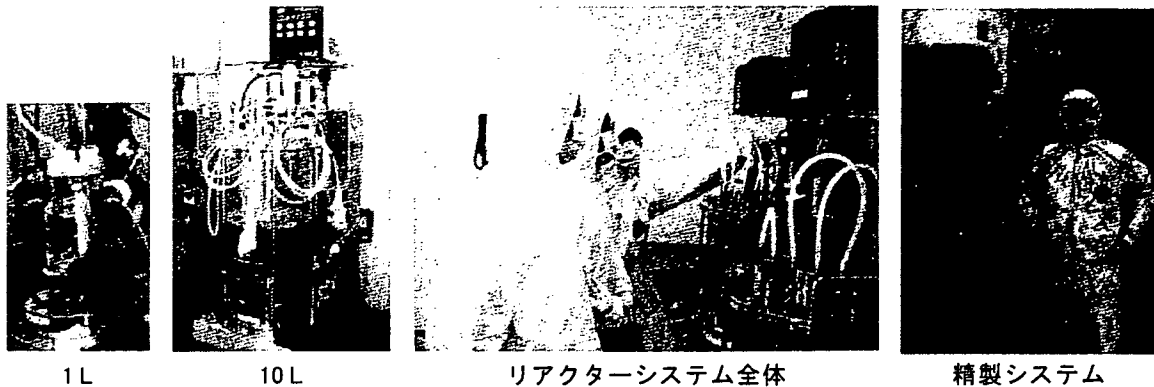
図9 凍結乾燥法による濃縮と製剤化検討

入する遺伝子医薬に応じて凍結乾燥条件の調整を行って、最終製剤化条件を設定した後に、工程のバリデーションと安定性試験を実施する予定である。また、品質管理項目や規格値については、現在暫定的に設定してデータの取得を行って、設定

が適切であるかを検討している状況である。今後は、規制当局との相談を通じて最終的な設定を進めていく予定である。

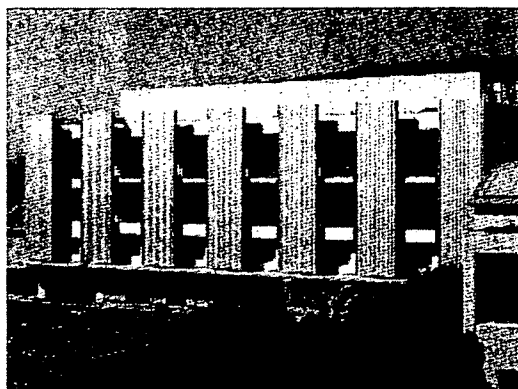
A. 製造用設備

バイオリアクターシステム

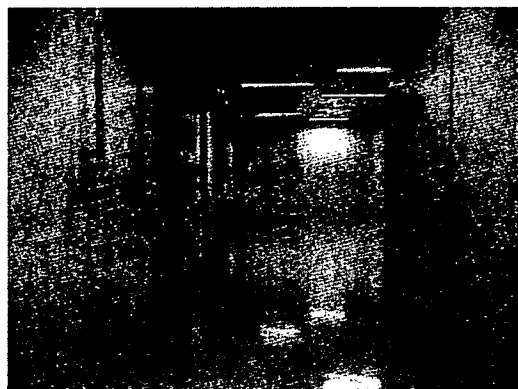


B. HVJ-エンベロープベクター製造用施設

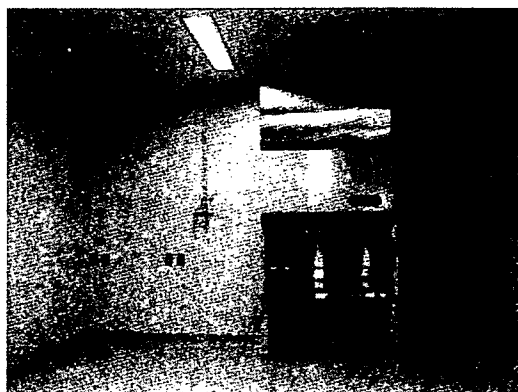
外 観



製造室(滅菌水, スチーム)



製造室(クリーンベンチ)



クリーン廊下



図 10 HVJ-エンベロープベクター製造用施設・設備の整備

## 4.6 HVJ-エンベロープベクターの製造設備

4.1項の確認申請に関する項目の7)に記述したように、HVJ-エンベロープベクターの確認申請で承認を得るためには、ベクター製造用施設・設備の整備が重要である。筆者らは、産業技術総合研究所・関西センターと共同で、規制当局のガイドラインに準拠したバイオ医薬品候補のための治験薬製造施設の整備を行い、製造用機器の設置前に施設バリデーションデータを取得した。その後、製造用機器を設置しており、上記のように製造工程のバリデーションを進めると並行して、施設についても稼動状態でのモニタリングを進めて、申請に必要なバリデーションデータを取得する予定である(図10)。

## 5. 今後の課題

将来、HVJ-エンベロープベクターを遺伝子医薬用のデリバリーシステムとして汎用性の高いデリバリーシステムとしていくためには、標的化ベクターを開発していくことが重要であると考えられる。現在までに、表面電荷の調整、化学的な修飾、エンベロープタンパク質のキメラ化(単鎖抗体、リガンドなど)、突然変異体の単離など種々のアプローチで標的化に最適な技術の開発を行っている。特に癌細胞への標的化は、治療の有効性を向上する上で重要であるため、今後重点的に開発を進めていきたい。

### 謝辞

本稿で取り上げたHVJ-エンベロープベクターの開発は、大阪大学大学院医学系研究科・遺伝子治療学教室の金田安史教授との共同研究のもとに行われた成果であり、研究・開発面でのサポートに深謝致します。製造技術開発においては、長年米国で遺伝子治療用ベクターの製造技術開発に携

わってきた小谷均氏の指導と、関連する技術開発を行った矢野高広、天満昭子、井岡進一、鈴木七保、宮地和恵、山内利栄、山崎継子、金子修平、成尾薫、加藤麻衣子の各氏に感謝致します。バイオリアクターシステムの開発はバイオット社との共同研究であり、関係するスタッフの方々に感謝致します。最後に、原稿作成にあたってサポート頂いた上田仁、石川幸子、森本陽子の各氏にも感謝致します。

HVJ-エンベロープベクターの開発は、NEDO(基盤技術研究促進事業)の支援を受けて実施致しました。

### 参考文献

- 1) The Journal of Gene Medicine 誌のClinical Trial site ホームページより抜粋 (<http://www.wiley.co.uk/genmed/clinical/>)
- 2) Kaneda Y. : Gene therapy: a battle against biological barriers. *Curr. Mol. Med.*, 1 : 493-499, 2001.
- 3) Wilson J. M. : Gendicine : the first commercial gene therapy product. *Hum. Gene Ther.*, 16 : 1014-1015, 2005.
- 4) Marshall E. : Gene therapy death prompts review of adenovirus vector. *Science*, 286 : 2244-2245, 1999.
- 5) Check E. : Gene therapy : A tragic setback. *Nature*, 420 : 116-118, 2002.
- 6) Kuroya M., Ishida N. and Shiratori T. : Newborn virus pneumonitis (type Sendai). II. The isolation of a new virus. *Tohoku J. Exp. Med.*, 58 : 62, 1953
- 7) Nagai Y. : Protease-dependent virus tropism and pathogenicity. *Trends Microbiol.*, 1 : 81-87, 1993.
- 8) Okada Y. and Hosokawa Y. : Isolation of a new variant of HVJ showing low cell fusion activity. *Biken J.*, 4 : 217-220, 1961.
- 9) Kohler G. and Milstein C. : Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature*, 256 : 495-497, 1975.
- 10) Lamb R. A., Paterson R. G. and Jardetzky T. S. : Paramyxovirus membrane fusion: lessons from the F

- and HN atomic structures. *Virology*, 344 : 30-37, 2006.
- 11) Fidgen K. J. : The action of *Vibrio cholerae* and *Corynebacterium diphtheriae* neuraminidases on the Sendai virus receptor of human erythrocytes. *J. Gen. Microbiol.*, 89 : 48-56, 1975.
  - 12) Kaneda Y., Yamamoto S. and Nakajima T. : Development of HVJ envelope vector and its application to gene therapy. *Adv. Genet.*, 53 : 307-332, 2005.
  - 13) Kaneda Y. : New vector innovation for drug delivery : development of fusigenic non-viral particles. *Curr. Drug Targets*, 4 : 599-602, 2003.
  - 14) Tsuboniwa N., Morishita R., Hirano T., Fujimoto J., Furukawa S., Kikumori M., Okuyama A. and Kaneda Y. : Safety evaluation of hemagglutinating virus of Japan--artificial viral envelope liposomes in nonhuman primates. *Hum. Gene Ther.*, 12 : 469-487, 2001.
  - 15) Griesenbach U., Inoue M., Hasegawa M. and Alton E. W. : Sendai virus for gene therapy and vaccination. *Curr. Opin. Mol. Ther.*, 7 : 346-352, 2005.
  - 16) Kaneda Y., Nakajima T., Nishikawa T., Yamamoto S., Ikegami H., Suzuki N., Nakamura H., Morishita R. and Kotani H. : Hemagglutinating virus of Japan (HVJ) envelope vector as a versatile gene delivery system. *Mol. Ther.*, 6 : 219-226, 2002.
  - 17) Kotani H., Nakajima T., Lai S., Morishita R. and Kaneda Y. : The HVJ-envelope as an innovative vector system for cardiovascular disease. *Curr. Gene Ther.*, 4 : 183-194, 2004.
  - 18) Nakamura N., Hart D. A., Frank C. B., Marchuk L. L., Shrive N. G., Ota N., Taira K., Yoshikawa H. and Kaneda Y. : Efficient transfer of intact oligonucleotides into the nucleus of ligament scar fibroblasts by HVJ-cationic liposomes is correlated with effective antisense gene inhibition. *J. Biochem. (Tokyo)*, 129 : 755-759, 2001.
  - 19) Shimamura M., Sato N., Oshima K., Aoki M., Kurinami H., Waguri S., Uchiyama Y., Ogihara T., Kaneda Y. and Morishita R. : Novel therapeutic strategy to treat brain ischemia: overexpression of hepatocyte growth factor gene reduced ischemic injury without cerebral edema in rat model. *Circulation*, 109 : 424-431, 2004.
  - 20) Oshima K., Shimamura M., Mizuno S., Tamai K., Doi K., Morishita R., Nakamura T., Kubo T. and Kaneda Y. : Intrathecal injection of HVJ-E containing HGF gene to cerebrospinal fluid can prevent and ameliorate hearing impairment in rats. *FASEB J.*, 18 : 212-214, 2004.
  - 21) Ito M., Yamamoto S., Nimura K., Hiraoka K., Tamai K. and Kaneda Y. : Rad51 siRNA delivered by HVJ envelope vector enhances the anti-cancer effect of cisplatin. *J. Gene Med.*, 7 : 1044-1052, 2005.
  - 22) Kita Y., Tanaka T., Yoshida S., Ohara N., Kaneda Y., Kuwayama S., Muraki Y., Kanamaru N., Hashimoto S., Takai H., Okada C., Fukunaga Y., Sakaguchi Y., Furukawa I., Yamada K., Inoue Y., Takemoto Y., Naito M., Yamada T., Matsumoto M., McMurray D. N., Cruz E. C., Tan E. V., Abalos R. M., Burgos J. A., Gelber R., Skeiky Y., Reed S., Sakatani M. and Okada M. : Novel recombinant BCG and DNA-vaccination against tuberculosis in a cynomolgus monkey model. *Vaccine*, 23 : 2132-2135, 2005.
  - 23) Yoshida S., Tanaka T., Kita Y., Kuwayama S., Kanamaru N., Muraki Y., Hashimoto S., Inoue Y., Sakatani M., Kobayashi E., Kaneda Y. and Okada M. : DNA vaccine using hemagglutinating virus of Japan-liposome encapsulating combination encoding mycobacterial heat shock protein 65 and interleukin-12 confers protection against *Mycobacterium tuberculosis* by T cell activation. *Vaccine*, 24 : 1191-1204, 2006.
  - 24) Tashiro H., Aoki M., Isobe M., Hashiya N., Makino H., Kaneda Y., Ogihara T. and Morishita R. : Development of novel method of non-viral efficient gene transfer into neonatal cardiac myocytes. *J. Mol. Cell Cardiol.*, 39 : 503-509, 2005.
  - 25) Kaneda Y. : Non-viral vectors for gene therapy, Ed. by Huang L., Hung M.-C. and Wagner E., Elsevier Academic Press, 2005.
  - 26) Mima H., Yamamoto S., Ito M., Tomoshige R., Tabata Y., Tamai K. and Kaneda Y. : Targeted chemotherapy against intraperitoneally disseminated colon carcinoma using a cationized gelatin-conjugated HVJ envelope vector. *Mol. Cancer Ther.*, 5 : 1021-1028, 2006.
  - 27) Yamano T., Kaneda Y., Huang S., Hiramatsu S. H. and Hoon D. S. : Enhancement of immunity by a DNA melanoma vaccine against TRP2 with CCL21 as an