

効果が期待できることを明らかにした。

日

F. 健康危険情報

特になし。

- 5) 水口裕之; 次世代アデノウイルスベクターの開発と生命科学研究への貢献; 近畿大学第3回ハイテクリサーチシンポジウム(大阪); 2008年9月27日

G. 研究発表

①論文発表

- 1) 水口裕之; アデノウイルスベクターの作製・増幅・精製法、*薬21*、印刷中
- 2) 水口裕之; 改良型アデノウイルスベクター開発の最前線、*薬21*、12、123-131 (2009)
- 3) 水口裕之; アデノウイルスベクター; **機能性DDSキャリアの製剤設計** (シーエムシー出版)、岡田弘晃監修、133-141 (2008)

H. 知的財産権の出願・登録状況
特になし。

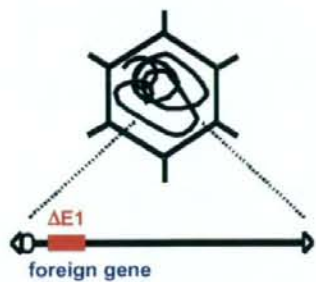
I. 研究協力者

- 川端健二 (独) 医薬基盤研究所
サブプロジェクトリーダー
- 櫻井文教 (独) 医薬基盤研究所
研究員
- 矢野小代里 (独) 医薬基盤研究所
実験補助員
- 山口朋子 (独) 医薬基盤研究所
研修生

②学会発表

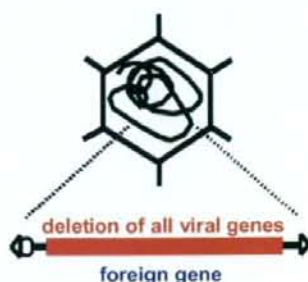
- 1) 水口裕之、次世代アデノウイルスベクターの開発と先端医療・生命科学研究への応用、第46回未来医療セミナー、大阪、2009年3月18日
- 2) 水口裕之、遺伝子導入技術開発と生命科学研究、東北大学 21世紀COE (CRESCENDO) 生活習慣病フォーラム、仙台、2009年3月10日
- 3) 水口裕之、次世代アデノウイルスベクターの開発と生命科学研究への応用、神戸学院大学(神戸)、2009年3月6日
- 4) 水口裕之; 次世代アデノウイルスベクターの開発; 様々な機能を備えた遺伝子導入技術の最前線 in神戸 ~臨床応用に向けた課題と今後展開~ (神戸); 2008年12月8日

1st generation
adenovirus vector



ウイルス遺伝子の発現
に伴う免疫反応、毒性の発現

helper-dependent (gutté) adenovirus vector



免疫反応の完全回避
毒性の軽減

図1. guttéアデノウイルスベクターの活用

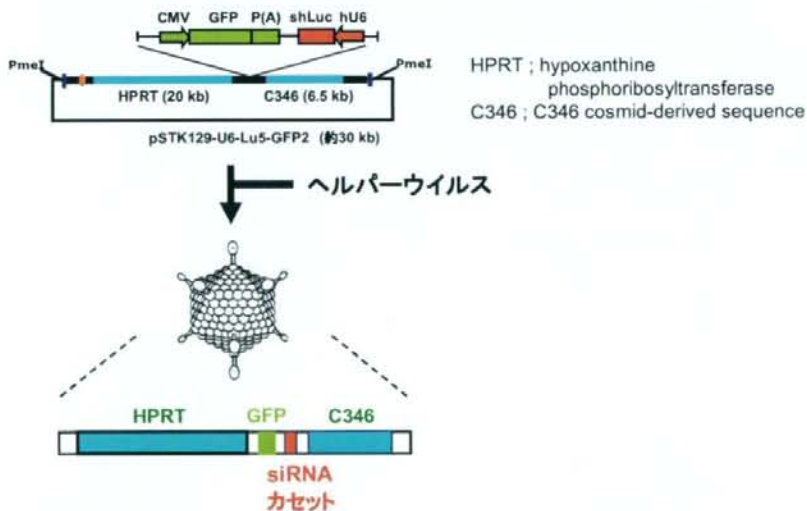
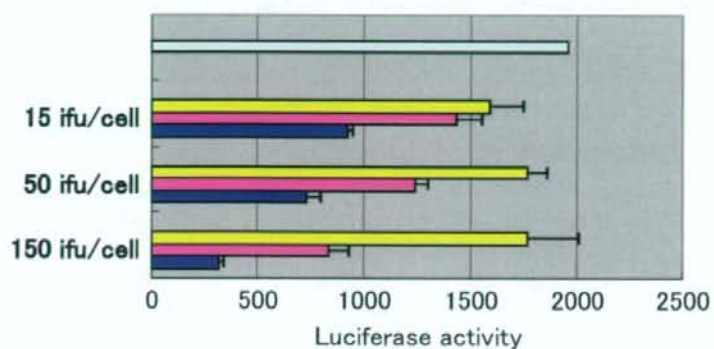


図2. 作製したguttéアデノウイルスベクター



- Uninfect (無処理)
- U6プロモーターだけを搭載したアデノウイルスベクター
- ルシフェラーゼに対するsiRNA発現カセットを搭載した従来型アデノウイルスベクター
- ルシフェラーゼに対するsiRNA発現カセットを搭載したguttredアデノウイルスベクター

図3. guttedアデノウイルスベクターによるRNAi活性の増強

人工リンパ組織の構築におけるサイトカインの有用性評価に関する研究

研究分担者 末松 佐知子 (独) 医薬基盤研究所 免疫細胞制御プロジェクト
プロジェクトリーダー

研究要旨

「人工リンパ組織」とは二次リンパ組織の特殊な組織構造と機能を模倣してマウスの生体内で組織工学的に構築した人工組織のことである。これまでの研究で人工リンパ組織の構築には導入するストローマ細胞が重要な役割を果たしていることが分かっている。より強力な獲得免疫機能を発揮する人工リンパ組織を構築するために数種類のストローマ細胞株を比較検討した結果、人工リンパ組織構築に用いるとリンパ球 (特に B リンパ球) を多数集積させるストローマ細胞株を見出した。このストローマ細胞が何らかのサイトカインを分泌することによって直接的、あるいは間接的に人工リンパ組織にリンパ球を多数集積させるメカニズムが存在していると考えている。またこのストローマ細胞による人工リンパ組織は効率よく抗原特異的な免疫反応を発揮する事が明らかとなった。これにより人工リンパ組織が機能性人工タンパク質の抗原性評価に有用であることが示された。

A. 研究目的

リンパ球を含む免疫細胞の集積を誘導して機能的な人工リンパ組織を構築するためにはストローマ細胞が重要な役割を果たしていることが明らかとなっている。本研究はストローマ細胞が発現する様々な分子の中からリンパ球や樹状細胞のホーミングに関与するサイトカイン分子や接着分子を検索し、強力な獲得免疫機能を有する人工リンパ組織を構築することを目的とする。

B. 研究方法

(1) ストローマ細胞 (2) 骨髄由来活性化樹状細胞 (BMDC)、及び (3) 生体適合性高分子材料 (コラーゲンスポンジ) を組み合わせてマウスの腎皮膜下に移植するとリンパ球や樹状細胞などがコラーゲンスポンジの周囲に集積して人工リンパ組織が構築される。予め、マウスを既知の抗原で免疫しておけばその抗原に特異的な (抗原を認識する) リンパ球も集積し、獲得免疫機能を発揮する人工リンパ組織が構築可能となる。

異なる組織由来の複数のストローマ細胞 (細胞株と初代培養細胞) を用いて構築した人工リンパ組織を T リンパ球あるいは B リンパ球の集積を指標として免疫組織学的に比較検討し、リンパ球、特に B リンパ球を多数集積させるストローマ細胞株を選択した (A 細胞株と略称する)。A 細胞株を用いた場合に人工リンパ組織に多くのリンパ球が集積するメカニズムを調べるため、A 細胞株の発現分子を DNA マイクロアレイで解析し、またリンパ組織性ケモカイン (CCL19, CCL21, CXCL12 及び CXCL13) については抗体を用いてタンパクレベルで

の発現の有無を検討した。

予め既知の抗原で免疫したマウスの腎皮膜下に A 細胞株と同じ抗原で刺激した BMDC をコラーゲンスポンジに組み込んで移植して人工リンパ組織を構築し、当該抗原に対する特異的な免疫反応を抗原特異的な抗体産生と T 細胞の活性化を検証した。

C. 研究結果

二次リンパ組織の発生にはその発生原基に存在するストローマ細胞が TNF ファミリー受容体を介したシグナルによってリンパ組織性ケモカインを発現することが重要であるとされている。そこで A 細胞株に *in vitro* で TNF ファミリー受容体刺激を加えて発現が誘導される分子を DNA マイクロアレイによって検討したところ、CCL19, CCL21, CXCL12 及び、CXCL13 などのリンパ組織性ケモカインは刺激の有無に関わらず発現していないという結果であった。次に市販のポリクローナル抗体を使って A 細胞株の免疫細胞染色を行ったところ、やはりこれらのケモカインの発現は確認できなかった。

一方、A 細胞株を導入して構築した人工リンパ組織にはリンパ球集団の近傍に通常の血管とは接着分子の発現が異なり、形態的にも特殊な血管構造がしばしば観察された。

さらに A 細胞株を用いて構築した人工リンパ組織では抗原に対して効果的に抗原特異的な抗体産生反応、及び、抗原特異的な T 細胞の活性化を誘導できることが分かった。

D. 考察

人工リンパ組織が強力な獲得免疫機能を発揮するためには抗原特異的リンパ球を含む免疫細胞を多数集積させる必要がある。今回の研究では A 細胞株によるリンパ組織性ケモカイン (CCL19, CCL21, CXCL12 及び CXCL13) の発現が確認できなかったことから、A 細胞株を用いて構築した人工リンパ組織へのリンパ球の遊走と集積には①「リンパ組織性ケモカイン以外のサイトカイン(ケモカインを含む)が関与」していると考えられる。また、A 細胞株を用いて構築した人工リンパ組織にはリンパ球の流入に関与していると考えられる特殊な血管構造が観察されたことより、②「A 細胞株が分泌する何らかのサイトカインがこの特殊な血管新生を誘導する」可能性も示唆される。別のストローマ細胞株に遺伝子を導入して B リンパ球ケモカインである CXCL13 を発現させた細胞株 (B-CXCL13 細胞と略称する) を用いて人工リンパ組織を構築した場合でも B リンパ球の集積は顕著でなく、また A 細胞株を用いて構築した人工リンパ組織に見られる特殊な血管構造が少ないという実験結果は前述の①と②の可能性を支持するものである。さらに A 細胞株を用いて構築した人工リンパ組織で抗原特異的抗体産生及び細胞性免疫能を効率よく誘導されたことから人工リンパ組織に抗原特異的なリンパ球が選択的に集積するメカニズムの存在が示唆される。

E. 結論

A 細胞株から分泌される何らかのサイトカインが人工リンパ組織へのリンパ球の遊走と集積に重要な役割を果たしている事はほぼ間違いがなく、このサイトカインを同定できれば、より簡便に優れた獲得免疫機能を発揮する人工リンパ組織を構築する事にもつながる。

また、A 細胞株を用いて構築した人工リンパ組織が効率のよい獲得免疫機能を発揮する事を証明できたことから、人工リンパ組織構築のシステムを機能性人工タンパク質の抗原性評価に応用することが可能になったと考えている。

F. 健康危険情報

該当せず

G. 研究発表

① 論文発表

Katakai T., Suto H., Sugai M., Gonda H., Togawa A., Suematsu S., Ebisuno Y., Katagiri K., Kinashi T., and Shimizu A. Organizer-Like reticular stromal cell layer common to adult secondary lymphoid organs. *J. Immunol.* 181(9): 6189-200, 2008

② その他

末松 佐知子; 人工リンパ組織構築とは何か. *Organ Biology* 15(1) 23-32, 2008

③ 学会発表

1. Suematsu S., Hattori Y., Characteristic vascular system induction is important for artificial lymphoid tissue construction and its immune function. 第 38 回日本免疫学会総会学術集会, 京都, 2008 年 12 月.

2. 服部 祐紀, 末松 佐知子, 松岡須美子, 竹下千恵; 腫瘍特異的人工リンパ組織による抗腫瘍効果. 第 8 回再生医療学会総会, 東京, 2009 年 3 月.

H. 知的財産権の出願・登録状況

① 特許取得

人工リンパ節

(特許第 4097544 号平成 20 年 3 月 21 日)

② 実用新案登録

③ その他

I. 研究協力者

服部祐紀

松岡須美子

竹下千恵

人工リンパ組織等の抗原性評価システムを用いたタンパク質の抗原性評価に関する研究

研究分担者 吉岡 靖雄 大阪大学臨床医工学融合研究教育センター 特任講師(常勤)

研究要旨

数多くの蛋白性医薬品が、種々難治性疾患に対して、従来にはない特異的な薬効を発揮する医薬品として医療に大きなインパクトを与えつつある。一方で近年、これら蛋白性医薬品を投与した患者で、投与した治療用蛋白質に対する抗体が惹起されるケースが多数報告されるようになってきた。その原因として、①蛋白性医薬品の製造工程・保存過程における蛋白質変性、②蛋白質そのものに存在する抗原性、が大きな鍵を握ると考えられている。本年度は、①抗体医薬として既に汎用されているハーセプチンを用い、熱処理による蛋白質の構造変化が免疫細胞に与える影響を評価するとともに、②蛋白質に内在する抗原性誘発ペプチドを評価可能なシステム構築、を試みた。

A. 研究目的

ホルモン、酵素、血液凝固因子、サイトカイン、抗体など数多くの蛋白性医薬品が、遺伝性疾患、代謝異常、循環器病、がん、免疫疾患、感染症などの各種疾病に対して、従来にはない特異的な薬効を発揮する医薬品として医療に大きなインパクトを与えてきた。これら多くの蛋白性医薬品は、ヒト由来蛋白質であるため、生体内に投与しても免疫反応は惹起されないと考えられていた。一方で近年、これら蛋白性医薬品を投与した患者で、投与した治療用蛋白質に対する抗体が誘導されるケースが多数報告されている。例えば、インターフェロン (IFN) β 、エリスロポエチンなどの蛋白性医薬品を投与された患者において、蛋白性医薬品特異的抗体が産生され、生理活性の著しい減弱ばかりでなく、思わぬ副作用が引き起こされている。この詳細な理由は定かでないが、蛋白性医薬品の製造工程・保存過程などで生じる蛋白質変性が一因であるとする報告がなされている。

一方で、生体内に投与された蛋白質製剤は、樹状

細胞などの抗原提示細胞に取り込まれ、10-30 アミノ酸のペプチドとしてヒト主要組織適合遺伝子複合体 (MHC) クラス II に抗原提示される。この MHC クラス II -ペプチド複合体を CD4 陽性 T 細胞が T 細胞受容体を介して認識し、抗原特異的 B 細胞を活性化することで抗原特異的抗体産生が惹起される。元来、ヒト由来蛋白質をヒトに投与した場合、このような免疫反応は惹起されないと考えられてきたが、近年の解析により、蛋白質製剤由来ペプチドが上記経路で抗原性を惹起することが示唆され、抗原性誘発ドメインの同定が急務となっている。

本研究では、蛋白性医薬品の安全性に、科学的合理性と社会的正当性を付与するためのレギュレーションを定め、医薬品行政の円滑な推進を図り、国民の保健衛生および生活の質の向上に資することを最終目的として、蛋白性医薬品の抗原性誘発メカニズムの解明及び抗原性評価システムを構築しようとするものである。本年度は、抗体医薬として既に汎用されているハーセプチンを用い、熱処理による蛋白質の構造変化に起因する免疫細胞への影響を評価し

た。また、MHC クラス II と蛋白質製剤由来ペプチドの結合力を指標とした抗原性評価システムの開発を目指し、基礎的検討を図った。

B. 研究方法

変性蛋白質の免疫細胞に与える影響

蛋白質製剤の熱処理；21 mg/ml のハーセプチンを95度で5分、15分、30分、60分間処理した。

IL-1 β 産生の評価；96穴プレートにヒトマクロファージ様細胞株 THP-1 細胞を 1.5×10^4 cells/well で播種し、熱変性処理したハーセプチンを最終濃度 400 μ g/ml、80 μ g/ml、16 μ g/ml、3.2 μ g/ml となるように加えた。6時間後、上清を回収し、IL-1 β 量を ELISA で測定した。

抗原性評価システムの開発

腹水採取；マウスにプリスタン 0.5 ml を腹腔内投与し、約1週間飼育した。その後、抗 HLA-DR 抗体を産生するハイブリドーマ LB3.1 細胞を、マウスの腹腔に接種し、10~14日後に腹水を回収した。

IgG 精製；上記で回収した腹水を用い、Melon Gel Monoclonal IgG 精製キット (PIERCE) により抗 HLA-DR 抗体を精製した。

抗体カラムの作成；精製した抗 HLA-DR 抗体を用い、アフィニティ H₂ イムノアフィニティキット (BIO-RAD) によりアフィニティカラムを作成した。

HLA-DR の精製；HLA-DR 発現 EBV 細胞を、10% FCS、1% グルタミン、1% 抗生物質含有 RPMI-1640 で培養した。 1.0×10^9 細胞に、約 20 ml の破砕溶液 (50 mM Tris (pH8.5)、1% Nonidet P-40、150 mM NaCl) を加え、氷上で1時間攪拌した。その後、27000g で30分遠心し、HLA を含む上清を回収した。この上清を抗体カラムに加え、洗浄液 (10mM Tris-HCl (pH8.0)、1% Nonidet P-40) でカラムを洗浄した後、溶出液 (0.15 M NaCl, 50 mM diethylamine,

0.4% octylglucoside, 0.02% NaN3) で HLA を溶出した。溶出液は、直ちに 2M Tris で中和した。

C. 研究結果

変性蛋白質の免疫細胞に与える影響

蛋白質製剤のモデルとして、抗体医薬として既に汎用されている抗 Her2 抗体ハーセプチンを用いた。蛋白質医薬品は、製造工程・保存過程で酸化・熱などのストレスにより若干変性することが知られている。そこで本年度は、ハーセプチンを人工的に熱処理し、変性蛋白質が免疫細胞に与える影響を評価した。ハーセプチンを95度で5分、15分、30分、60分間熱処理した結果、目視では白濁などは観察されなかったが、蛋白質凝集の指標である A280/260 の低下が観察された (Fig. 1)。次に、これら変性蛋白質の免疫細胞に与える影響を検討した。熱処理したハーセプチンを、ヒトマクロファージ様細胞株 THP-1 細胞に加え、6時間後に上清中の IL-1 β 産生量を ELISA にて測定した。その結果、未処理群では全く IL-1 β 産生は認められなかったのに対して、熱処理群では熱処理時間依存的に IL-1 β 産生の増大が観察された (Fig. 2)。本検討では、加える蛋白質の濃度依存的な IL-1 β 産生の増大はクリアに観察されなかったことから、今後より詳細な検討は必要であるが、ハーセプチンの熱処理により免疫細胞を活性化する可能性が示唆された。

抗原性評価システムの開発

生体内において抗原 (異物) は樹状細胞などの抗原提示細胞に取り込まれ、10-30 アミノ酸のペプチドとして MHC クラス II に抗原提示される。この MHC クラス II -ペプチド複合体を CD4 陽性 T 細胞が T 細胞受容体を介して認識し、抗原特異的 B 細胞を活性化することで抗原特異的抗体産生が惹起される。この過程で、抗原が持つ「抗原性」の強弱 (抗体誘導能) は、CD4 陽性 T 細胞の活性化や、プロセッシングを受けたペプチドの MHC クラス II に対する結合親和性の強弱と正の相関を示すことが知られている。そこで本研究では、蛋白質製剤由来ペプチドの MHC クラス II への結合親和性を指標と

した、簡便かつ再現性よく抗原性を評価可能な *in vitro* 評価システムの確立を図った。本研究では、多種類の MHC クラス II 分子を得ることが大きな鍵となる。しかし、MHC クラス II 分子は、当然販売されておらず、大腸菌、酵母などを用いたリコンビナント蛋白質の作成も困難とされている。そこで、単一の MHC クラス II 分子を大量発現している B 細胞株から精製する方法を試みた。ヒト MHC クラス II 分子 (HLA-DR) に対する抗体を発現するハイブリドーマを入手し、マウス腹水から抗体を回収した。SDS-PAGE 解析の結果から、高純度の抗体が得られていることが示された (Fig. 3)。抗 HLA-DR 抗体を用いアフィニティークラムを作成した後、単一の HLA-DR 分子を大量に発現する細胞株の破砕液をアフィニティークラムに通すことで、HLA-DR を 2 種類 (HLA-DR7、HLA-DR9) 大量に精製することに成功した。次に、精製した HLA-DR の特性評価のため、SDS-PAGE 解析を行った (Fig. 4)。HLA-DR7、HLA-DR9 共に、還元剤存在下で加熱後、SDS-PAGE 解析すると 30KDa 付近に α 、 β 鎖と考えられるバンドが観察された。これまでの報告から、機能的な HLA-DR 蛋白質は、還元剤存在下で非加熱で SDS-PAGE 解析すると、 α 、 β のヘテロダイマーが観察されることが知られている。そこで次に、精製した HLA-DR7、HLA-DR9 蛋白質を、還元剤存在下で非加熱で SDS-PAGE 解析したところ、 α 、 β 鎖の個々のバンドが消失し、 $\alpha\beta$ 鎖ヘテロダイマーと予想されるバンドが観察された。以上の結果から、精製度は 50-70% であるが、機能的な HLA-DR が精製されていることが示された。

D. 考察

本年度はハーセプチンを用い、熱処理による蛋白質変性、免疫細胞に与える影響に関して検討した。その結果、熱処理により蛋白質変性が誘発され、マクロファージを活性化させる可能性が示唆された。IL-1 β は、炎症反応のトリガーとして TNF α や IL-6 など他の炎症性サイトカインを誘導することで免疫を活性化させ、過剰な免疫応答を誘導することが知られている。近年、アルツハイマー病発症に関与す

る変性蛋白質 β アミロイドが、脳内マクロファージであるミクログリアからの IL-1 β 産生を誘発することで、免疫反応を惹起する報告がなされている。従って、蛋白質製剤の変性によっても、IL-1 β 産生に引き続く免疫反応が誘導される可能性が示唆され、より詳細な検討が今後必要と考えられる。

実際の医薬品の製造工程・保存過程で、どの程度このような現象が誘導されているかは不明である。しかし、現在販売されている蛋白性医薬品においても、長期保存において蛋白質が変性しているとの報告もある。今後は、他の蛋白質医薬品においても、長期保存などにおいてどの程度、蛋白質変性が誘発されるかに関して検討する予定である。

また、機能的な HLA-DR を精製する方法論の確立に成功した。今後は、より多くの HLA-DR の精製を試みると共に、精製 HLA-DR と蛋白質製剤由来ペプチドとの結合力を評価することで、蛋白質製剤に内在する抗原性誘発ペプチドの同定を試みる予定である。

E. 結論

①ハーセプチンを熱処理することで、蛋白質変性が生じ、マクロファージの活性化を惹起する可能性が示唆された。

②MHC クラス II とペプチドの結合性を指標とした抗原性評価システムの構築に向けて、機能的な MHC クラス II の精製に成功した。

F. 健康危険情報

該当無し

G. 研究発表

①論文発表

無し

②学会発表

無し

H. 知的財産権の出願・登録状況

①特許取得

無し

②実用新案登録

無し

③その他

無し

I. 研究協力者

無し

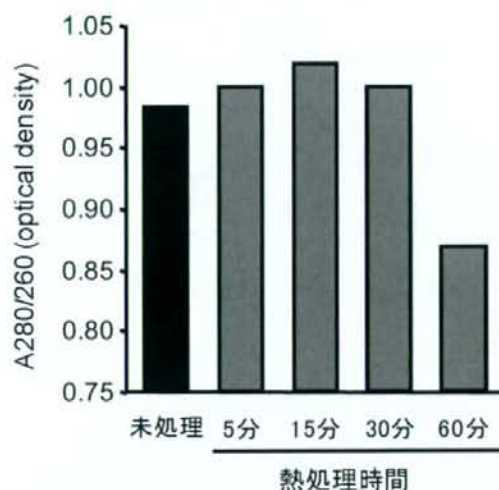


Fig 1. ハーセブチンの熱処理による蛋白質変性.ハーセブチンを95度で5分、15分、30分、60分間熱処理し、蛋白質変性の1つの指標であるOD280/260を測定した。

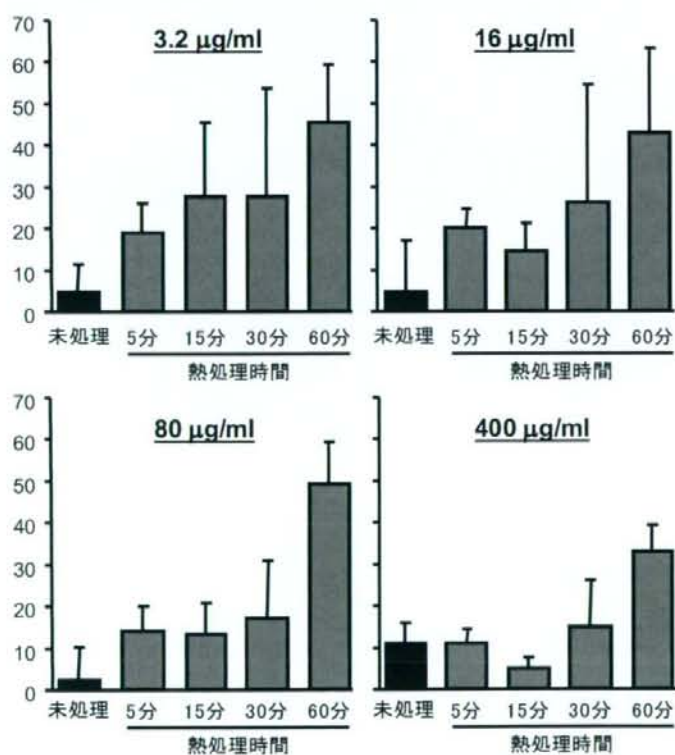


Fig 2. 熱処理ハーセブチンをマクロファージに処理した際に誘導されるIL-1β量.ハーセブチンを95度で5分、15分、30分、60分間熱処理した後、各濃度のサンプルをTHP-1細胞に加えた。6時間後に、培養上清中のIL-1β量をELISAにより測定した。

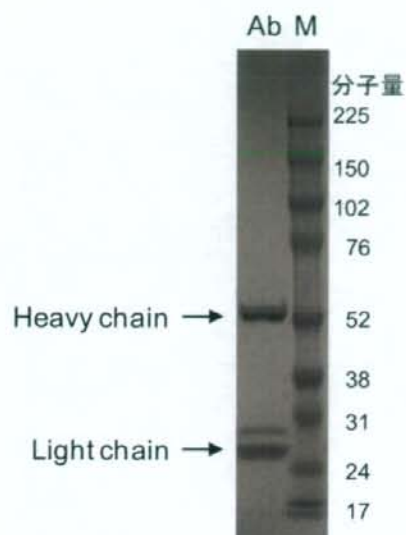


Fig 3. 精製抗 HLA-DR 抗体の SDS-PAGE 解析。精製した抗 HLA-DR 抗体を SDS-PAGE し、クマシーブルー染色した。Ab ; 抗 HLA-DR 抗体、M ; プロテインマーカー

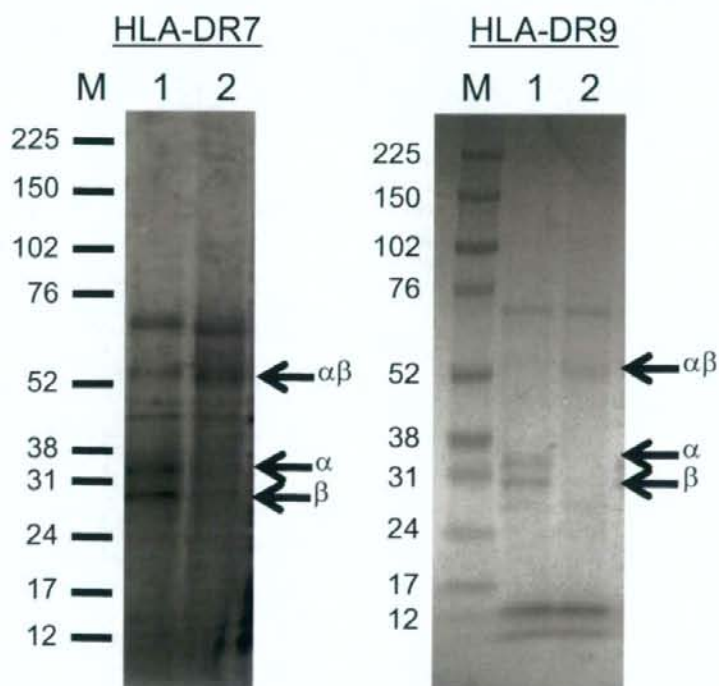


Fig 4. 精製 HLA-DR の SDS-PAGE 解析。HLA-DR を SDS-PAGE し、クマシーブルー染色した。Lane 1 ; 還元剤存在下で加熱処理したサンプル、Lane 2 ; 還元剤存在下で非加熱処理のサンプル、M ; プロテインマーカー

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍・総説

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書 籍 名	出版社名	出版地	出版年	ページ
水口裕之	アデノウイルスベクター	岡田弘晃	機能性 DDS キャリアの製剤設計	(株)シーエムシー出版	東京都	2008	133-141
水口裕之	改良型アデノウイルスベクター開発の最前線		脳21	(株)金芳堂	京都府	2009	123-131
水口裕之	アデノウイルスベクターの作製・増幅・精製法		脳21	(株)金芳堂	京都府	印刷中	
末松佐知子	人工リンパ組織構築とは何か		Organ Biology	日本臓器保存生物医学会	東京都	2008	23-32

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Shibata H., Yoshioka Y., Ohkawa A., Minowa K., Mukai Y., Abe Y., Taniyai M., Nomura T., Kayamuro H., Nabeshi H., Sugita T., Imai S., Nagano K., Yoshikawa T., Fujita T., Nakagawa S., Yamamoto A., Ohta T., Hayakawa T., Mayumi T., Vandeenabeele P., Aggarwal BB., Nakamura T., Yamagata Y., Tsunoda S., Kamada H., Tsutsumi Y.	Creation and X-ray structure analysis of the tumor necrosis factor receptor-1-selective mutant of a tumor necrosis factor-alpha antagonist.	J. Biol. Chem.	283	998-1007	2008
Sugita T., Yoshikawa T., Mukai Y., Yamanada N., Imai S., Nagano K., Yoshida Y., Shibata H., Yoshioka Y., Nakagawa S., Kamada H., Tsunoda S., Tsutsumi Y.	Comparative Study of the Protein Transduction Domains-Mediated Molecular Transduction.	Br. J. Pharmacol.	153(6)	1143-1152	2008

Abe Y., Yoshikawa T., Kamada H., Shibata H., Nomura T., Minowa K., Kayamuro H., Katayama K., Miyoshi H., Mukai Y., Yoshioka Y., Nakagawa S., Tsunoda S., Tsutsumi Y.	Simple and highly sensitive assay system for TNFR2-mediated soluble- and transmembrane-TNF activity.	J. Immunol. Methods.	335(1-2)	71-78	2008
Yoshikawa T., Sugita T., Mukai Y., Yamanada N., Nagano K., Nabeshi H., Yoshioka Y., Nakagawa S., Abe Y., Kamada H., Tsunoda S., Tsutsumi Y.	Organelle-targeted delivery of biological macromolecules using the protein transduction domain: Potential applications for peptide aptamer delivery into the nucleus.	J. Mol. Biol.	380(5)	777-782	2008
Imai S., Mukai Y., Takeda T., Abe Y., Nagano K., Kamada H., Nakagawa S., Tsunoda S., Tsutsumi Y.	The effect of protein properties on display efficiency using the M13 phage display system.	Pharmazie	63(10)	760-764	2008
Mukai Y., Shibata H., Nakamura T., Yoshioka Y., Abe Y., Nomura T., Taniai M., Ohta T., Ikemizu S., Nakagawa S., Tsunoda S., Kamada H., Yamagata Y., Tsutsumi Y.	Structure-function relationship of tumor necrosis factor (TNF) and its receptor interaction based on 3D structural analysis of a fully active TNFR1-selective TNF mutant.	J. Mol. Biol.	385	1221-1229	2009
Imai S., Yoshida Y., Okamura T., Nagano K., Abe Y., Yoshikawa T., Kamada H., Nakagawa S., Tsunoda S., Tsutsumi Y.	The specific effect of 2-Methoxyestradiol on lymphatic vascular endothelial cells.	Pharmazie		in press.	
Mukai Y., Nakamura T., Yoshioka Y., Tsunoda S., Kamada H., Nakagawa S., Yamagata Y., Tsutsumi Y.	Crystallization and preliminary X-ray analysis of TNF-TNFR2 complex	Acta. Crystallogr. Sect. F.		in press	
Katakai T., Suto H., Sugai M., Gonda H., Togawa A., Suematsu S., Ebisuno Y., Katagiri K., Kinashi T., and Shimizu A.	Organizer-Like reticular stromal cell layer common to adult secondary lymphoid organs.	J. Immunol.	181(9)	6189-6200	2008

12 アデノウイルスベクター

水口裕之*

12.1 はじめに

本稿では、遺伝子導入ベクターとして汎用されているアデノウイルスベクターの諸性質や、機能面で優れた改良型アデノウイルスベクターの開発現状について、著者らの研究成果を交えながら解説する。

12.2 アデノウイルスの性質

遺伝子導入ベクターとして汎用されているアデノウイルスベクターは、主にヒト5型アデノウイルス (sub-group Cに属する) を基盤としている。ヒトアデノウイルスはこれまでに51種類の血清型が発見されており、ヒトの他にトリ・ウシ・サル・イヌ・マウス・ブタ等を宿主とするアデノウイルスの存在も明らかにされている。ヒトアデノウイルスは、臨床的には小児期に急性気道炎、角結膜炎、膀胱炎等を起こす。米国では、約30年以上もの間、約100万人の兵士に対しワクチンとしてアデノウイルスが投与され、重篤な副作用を示さなかったという特徴を持つ。

アデノウイルスは、エンベロープを持たず、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突起構造を持った12個はペントン (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 (図1)。ウイルスの細胞内への侵入は、ファ

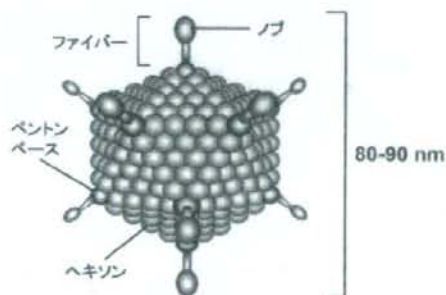


図1 アデノウイルスの構造

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個は突起構造を持ったペントン (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。

* Hiroyuki Mizuguchi 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

イパーがアデノウイルス受容体 (coxsackievirus-adenovirus receptor (CAR) ; 2型や5型等の多くのヒトアデノウイルスにおける受容体) に結合し、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 ($\alpha_3\beta_1$, $\alpha_3\beta_3$) に結合することによって起こる。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。細胞質内に導入されたウイルスゲノムの核への移行は効率良く起こり、細胞に感染したウイルスの50~80%は60分以内に核に到達する。核内に導入されたウイルスゲノムは、ゲノム両端のITR (inverted terminal repeat) 領域に結合するアデノウイルスDNAポリメラーゼと末端タンパク質前駆体 (pre-terminal protein)、宿主由来のタンパク質等との複合体を介して環状化し、核マトリックスに結合した状態で存在する (図2)。

ヒトアデノウイルスは約36kbの線状二本鎖DNAをゲノムとして持ち、その遺伝子構造は初期遺伝子のE1~E4と、後期遺伝子のL1~L5に大別される。初期遺伝子は主にウイルスDNAの複製に、後期遺伝子は主に構造タンパク質の合成に関与する。遺伝子治療用ベクターとして用いられているアデノウイルスベクターは、70以上にも及ぶウイルスタンパク質の合成を誘導する初期遺伝子であるE1領域 (E1領域はE1AとE1Bに分けられ、E1Aにより全てのアデノウイル

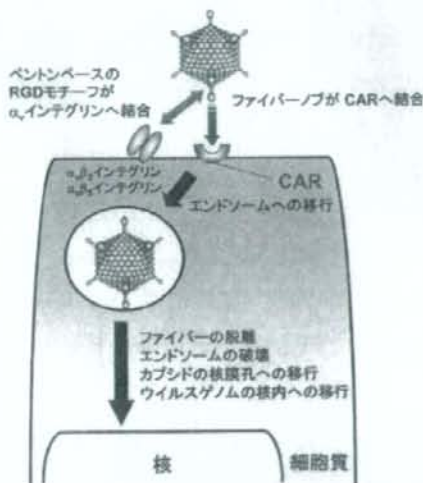


図2 アデノウイルスの細胞への感染様式

アデノ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モチーフと細胞表面上のインテグリン ($\alpha_3\beta_1$, $\alpha_3\beta_3$ など) との相互作用で内在化を受けることによって起こる。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。

スのプロモーターが活性化される)を外来遺伝子に置き換え、E1タンパク質を恒常的に発現している細胞株である293細胞等で増殖させる。したがって、E1領域を欠損したアデノウイルスベクターは、E1タンパク質を発現していない通常の細胞では増殖できず、非増殖型ウイルスとなる。

12.3 アデノウイルスベクターの特徴

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(例えば、非ウイルスベクターのカチオン性リボソーム・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¹⁾)、②導入遺伝子が宿主染色体への組み込み活性を持たず、染色体外にエピゾ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できれば、数ヶ月以上の長期の遺伝子発現を示す)、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)のベクターが得られること(通常、他のウイルスベクターに比べ1000倍以上)、等の長所を有し、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、等の問題点を有し、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、著者らを含め欧米を中心にして盛んに行われている。

12.4 アデノウイルスベクターの作製法

アデノウイルスベクターを作製する方法は、これまで種々報告されているが、結局はどういう方法でE1領域を外来遺伝子に置き換えるかということに集約される。以前は、パッケージング細胞である293細胞内での相同組換えを利用して、E1領域を外来遺伝子に置き換える方法が主に用いられてきたが、煩雑で効率が良くないことが問題であった。現在では、E1領域を外来遺伝子に置き換えたウイルスゲノム全長を含んだプラスミドやコスミドをあらかじめ作製し、これを293細胞にトランスフェクションすることで簡便にベクターが作製できるようになっている²⁾。例えば著者らは、簡便な*in vitro*ライゲーションに基づいたプラスミド構築を利用したアデノウイルスベクター作製法を開発しており(キット化済み)(図3)^{3,4)}、世界的に広く利用されている。本法は原理的にも手技的にも容易であり、分子生物学の基本的な知識・技術を取得していれば、誰でも簡単にアデノウイルスベクターを作製できるようになっている。

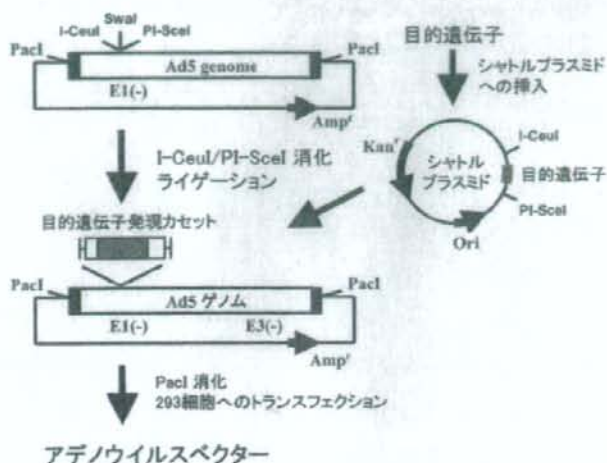


図3 *in vitro*ライゲーションに基づいた簡便なアデノウイルスベクターの作製

シャトルプラスミドに目的遺伝子（ここでは β ガラクトシダーゼ（LacZ）を用いた）を組み込み、I-CeuIとPI-SceIで切断する。これをI-CeuIとPI-SceIで切断したアデノウイルスDNAを含んだベクタープラスミドとライゲーションする。作製した組換えプラスミドをアデノウイルスゲノム両末端に存在する制限酵素部位PacIで切断し、293細胞にトランスフェクションするとアデノウイルスベクターができる。

12.5 アデノウイルスベクターの遺伝子治療への適用

アデノウイルスベクターは、ゲノムが染色体外DNAとして核内に存在し、宿主染色体には組み込まれないため、基本的には数週間から数ヶ月程度の一過性の遺伝子発現しか示さない。そのため、生涯にわたって治療用遺伝子の発現が期待される単一の遺伝性疾患に対する遺伝子治療への適用例は少ない（後述するguttedアデノウイルスベクターでは、数年にわたる長期間の遺伝子発現が得られるため、単一の遺伝性疾患に対する遺伝子治療への適用も可能である）。むしろ、一過性の遺伝子発現が好ましい癌や血管新生の誘導を要する後天性疾患（末梢性血管疾患、虚血性心疾患等）に対するベクターとして汎用されている。アデノウイルスベクターは炎症を惹起する副作用を伴うが、癌に対する適用では、この性質は癌に対する免疫を活性化するという意味で、かえって長所にもなりうる。癌に対する遺伝子治療では、p53遺伝子（癌抑制遺伝子）や、サイトカイン遺伝子、自殺遺伝子（herpes simplex virus thymidine kinase 遺伝子等）等を、末梢性血管疾患、虚血性心疾患等に対する遺伝子治療では、血管新生作用のあるVEGF（vascular endothelial growth factor）遺伝子等を発現するアデノウイルスベクターを直接体内に投与する*in vivo*遺伝子治療が広く行われている。また、癌細胞でのみ複製能を示すように、E1AあるいはE1B遺伝子に変異を施したり、E1A（とE1B）の発現を腫瘍特異的プロモーターで制御した

アデノウイルスが、癌に対するウイルス療法として開発され、欧米において臨床応用が進んでいる。なお、中国においては、p53を発現するアデノウイルスベクター（Gendicine）やE1B遺伝子に変異を有した制限増殖型アデノウイルス（H101）が既に癌に対する医薬品として承認されている。

12.6 次世代アデノウイルスベクターの開発

12.6.1 Guttedアデノウイルスベクター

アデノウイルスベクターが*in vivo*において一過性の遺伝子発現しか示さない原因として、ベクター感染細胞において産生された少量のウイルスタンパク質に対して細胞性免疫が生じることがあげられる。当初、初期遺伝子のE1領域を欠損した第1世代のアデノウイルスベクターは、通常の細胞ではウイルスタンパク質の産生は起こらないものと考えられていた。しかし、宿主由来のE1様タンパク質の働きや、非特異的な転写等によりウイルスタンパク質の産生が極少量ながら起こり、それが炎症を引き起こしたり、ベクター感染細胞が細胞傷害性T細胞の標的となることによって除去され、結果的に目的遺伝子の発現が一過性にとどまることが明らかとなった。そこで、ウイルスゲノムの複製とパッケージングに必要な領域（左端約0.4kb、右端約0.2kb）以外の全てのウイルス遺伝子を欠損させたguttedアデノウイルスベクターが開発されている（通常ヘルパーウイルスを利用してベクターを作製することからヘルパー依存性アデノウイルスベクターと呼ばれることも多い）⁵（図4）。Guttedアデノウイルスベクターを用いた動物実験では、

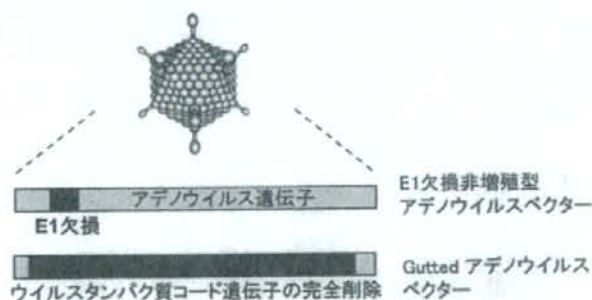


図4 Guttedアデノウイルスベクター

E1欠損アデノウイルスベクターを細胞に作用させると、外来遺伝子の発現だけでなく、ごく少量ではあるがウイルスタンパク質の産生も起こる。産生されたウイルスタンパク質は、動物個体では免疫反応のターゲットとなる。一方、guttedアデノウイルスベクターにおいては、ウイルスタンパク質コード遺伝子を完全に欠損しているため、ウイルスタンパク質の産生は全く起こらず、外来遺伝子の産生のみが認められる。そのため、guttedアデノウイルスベクターでは動物個体においても、長期間（モデルによっては一生涯）の遺伝子発現が得られる。

肝臓、筋肉、脳、肺等の様々な組織を標的としたもので効果が報告されており、標的組織での大幅な炎症の抑制や長期にわたる外来遺伝子の発現がみられており、高い安全性・有効性を示すことが明らかになっている⁵⁾。ヘルパーウイルスを用いる gutted ベクター系では、高力価のベクターを得るためには調製したベクターをヘルパーウイルスと共に何度も（通常4～5回以上）293細胞に感染させる必要があるなど手間がかかることが欠点であるが（最近では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⁶⁾）、これらの問題点が解決されれば、gutted アデノウイルスベクターはアデノウイルスをベースとした将来の遺伝子治療ベクターの主流になると考えられる。

12.6.2 カプシド改変アデノウイルスベクター

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2、5）。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、血管平滑筋細胞等は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カプシド改変アデノウイルスベクターの開発が進められている。例えば、 α 、インテグリンに親和性がある

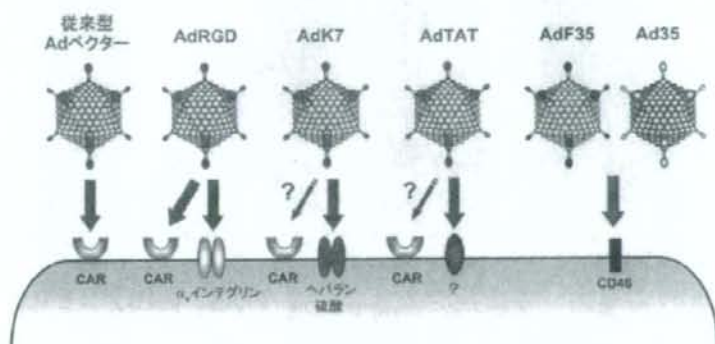


図5 カプシド改変アデノウイルスベクター

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アデノウイルスベクター（AdRGD、AdK7）はCARだけでなく α 、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、11型や35型のアデノウイルスのファイバーを有したベクター（AdF11、AdF35）や、全ての構造タンパク質が11型あるいは35型アデノウイルスからなるベクター（Ad11、Ad35）は、CD46を認識して感染する（11型アデノウイルスはCD46に加え、他の分子（未同定）も認識することが想定されている）。

るRGD (Arg-Gly-Asp) ペプチドや、ヘパリ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⁷⁻⁹⁾ (図5)。また、ファイバー領域を、ヒト由来細胞ではほとんど全ての細胞が発現しているCD46 (補体制御因子として機能している) を認識する11型や35型アデノウイルス (共にsub-group Bに属する) 由来のものに置換したり、全ての構造タンパク質が11型や35型アデノウイルスからなる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, 11)}。

このようなカプシド改変アデノウイルス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細胞等、様々な細胞への適用が可能になっており^{11, 12)}、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) 等、広範な応用研究への適用が可能になった。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共に、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。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。

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。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領域のKKTKからなるヘパリン結合ドメインが、 α_v インテグリンやヘパリン硫酸と結合して起こる感染ルートも知られている¹³⁾。また、factor X等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^{14, 15)}。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ターゲティング分子をウイルス表面タンパク質に付与すれば、ターゲティング能を持ったアデノウイルスベクターが開発できる。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ベクターを開発し (図6)、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^{16, 17)}、さらには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 (ヘキソンとヘキシソンの間に存在するタンパク質) に簡便にターゲティング分子を挿入する技術も開発済みである¹⁸⁾。このような基盤ベクターに、標的細胞特異的に高親和性に結合活性を有するターゲティング分子を付与すれば、ターゲティング能を持ったアデ