

(2) 改変型 tissue-plasminogen activator (t-PA)

・ Reteplase (Retavase[®])

t-PA のドメインのうち、K2 ドメイン (Kringle2 ドメイン) と P ドメイン (プロテアーゼドメイン) の2つのドメインのみからなる改変体。非改変型の t-PA では血中半減期が約 3 分であるため、点滴静注 (持続投与) によりようやく薬効が得られるが、Reteplase の血中半減期は 90 分以上と延長されており、単回の静脈内投与が可能となっている。また、フィブリン親和性減少のため、血栓への浸透性が高く、血栓の速やかな溶解が可能であるとされている。

・ Tenecteplase (TNKase[®])

t-PA の K1 ドメインの 103 番目の Thr を Asn に、117 番目の Asn を Glu に置換し、P ドメインの4つの Ala を置換した改変体。非改変型と比較して、フィブリン親和性および、t-PA の阻害因子である plasminogen activator inhibitor-1 への抵抗性が上昇し、血中半減期が延長されている。

・ Pamiteplase パミテブラーゼ (ソリナーゼ[®])

t-PA の K1 ドメインを欠損させ、天然型 t-PA で N 末端から 275 番目の Arg を Glu に置換した改変体。フィブリンに対する高い親和性を有し、プラスミノゲン活性化作用がフィブリンにより顕著に増強され、血中半減期も延長されている。

(3) 改変型インターフェロン

・ Interferon alfacon-1

インターフェロン アルファコン-1 (アトパフェロン[®])

ヒトインターフェロンアルファの 12 種類のサブタイプのアミノ酸配列において、各位置のアミノ酸を出現頻度の最も高いアミノ酸に置換した改変体。コンセンサスインターフェロンとも呼ばれる。現在臨床に供されている「PEG 非修飾型」のインターフェロンアルファ (主としてインターフェロン α2a/α2b) と比較して、高い抗ウイルス活性、抗肝炎活性を示す。

(4) 改変型顆粒球コロニー刺激因子

・ Nartograstim ナルトグラスチム (ノイアップ[®])

Granulocyte colony stimulating factor (G-CSF) の N 末端側から 1, 3, 4, 5, 17 番目のアミノ酸が Ala, Thr, Tyr, Arg, Ser に置換した改変体。天然型の G-CSF と比較して、約 3 倍の比活性を示す。

2.2 糖鎖改変型

(1) 糖鎖改変型グルコセレブロシダーゼ

・ Imiglucerase イミグルセラゼ (セレザイム[®])

CHO 細胞で生産された β-グルコセレブロシダーゼをシアリダーゼ、β-ガラクトシダーゼおよびヘキソサミニダーゼの酵素処理により糖鎖末端をマンノースにした改変体。標的細胞であるマクロファージ表面に存在するマンノース受容体を介して細胞に取り込まれる。レセプターへの標的指向能、レセプター介在性のエンドサイトーシスを有する DDS 製剤と位置づけられる。

(2) 糖鎖改変型エリスロポエチン

・ Darbepoetin alfa ダルベポエチン アルファ (ネスブ[®])

5カ所のアミノ酸置換により、天然の erythropoietin (EPO) に N 型糖鎖結合部位を新たに 2カ所導入した改変体。天然の EPO には 3本の N 結合型糖鎖と 1本の O 結合型糖鎖が付加されているが、ダルベポエチンアルファでは、5本の N 結合型糖鎖と 1本の O 結合型糖鎖が結合している。結合糖鎖が増えることにより血中半減期が延長され、投与量・投与回数の削減が期待される。

2.3 PEG 結合型

(1) PEG 結合型インターフェロン

・ Peginterferon alfa-2a

ペグインターフェロン アルファ-2a (ペガシス[®])

インターフェロンアルファ-2a のリジン残基 (主な部位：第 31 位、第 121 位、第 131 位、第

134位)の1カ所に、1分子の分枝ポリエチレングリコール(分子量:約40,000)が、アミド結合を介して共有結合している修飾タンパク質(分子量:約60,000)。血中半減期が従来の約10倍に延長されており、投与量・投与回数の削減、抗原性の低下が期待される。そのため、患者のコンプライアンスの向上に大きく貢献している。

・Peginterferon alfa-2b

ペグインターフェロン アルファ-2b
(ペグイントロン[®])

インターフェロンアルファ-2bのアミノ酸残基(Cys¹, His⁷, Lys³¹, His³⁴, Lys⁴⁹, Lys⁸³, Lys¹¹², Lys¹²¹, Tyr¹²⁹, Lys¹³¹, Lys¹³³, Lys¹³⁴, Ser¹⁶³およびLys¹⁶⁴)の1カ所に1分子のメトキシポリエチレングリコール(平均分子量:約12,000)がカルボニル基を介して共有結合している修飾タンパク質(分子量:約32,000)。血中半減期が延長されており、投与量・投与回数の削減、抗原性の低下が期待される。

(2) PEG 結合型顆粒球コロニー刺激因子

・Pegfilgrastim (Neulasta[®])

大腸菌で生産されたG-CSF(フィルグラスチム)のN末端アミノ酸に、メトキシポリエチレングリコールプロピオンアルデヒド(平均分子量:約20,000)を1分子結合させた修飾タンパク質。血中半減期が延長されており、投与量・投与回数の削減が期待される。

(3) PEG 結合型成長ホルモン誘導体

・Pegvisomant ペグビソマント(ソマバート[®])

Human growth hormone(hGH)のアミノ酸配列を9カ所置換することにより、hGH受容体アンタゴニストとして作用するよう改変したタンパク質にPEG化を施した修飾タンパク質。タンパク質1分子あたり、4~6分子のPEG(分子量5,000)がLys残基に結合しており、体内安定性や血中滞留性の

向上が期待される。

2.4 融合タンパク質

・Denileukin Diftitox (Ontak[®])

Diphtheria toxinの一部(Met1~Thr387)-HisとInterleukin 2(IL-2)の一部(Ala1~Thr133)からなる融合タンパク質。リンパ腫細胞表面のIL-2受容体に結合し、受容体リガンド複合体として細胞内に取り込まれる。IL-2受容体の発現細胞へのターゲティング能を有し、これらの細胞特異的にジフテリアトキシンによるタンパク質合成阻害に基づいた細胞死を誘導する。

・Etanercept エタネルセプト(エンブレル[®])

ヒトTumor necrosis factor(TNF)受容体p75の細胞外のリガンド結合ドメインとヒトIgGのFc部分の融合タンパク質。細胞表面のTNF受容体へのTNFの結合を拮抗的に阻害する。Fc部分は血中半減期延長や可溶性受容体の二量化(リガンド【TNF】への親和性向上)の役割を持つ。

・Alefcept (Amevive[®])

ヒトleukocyte function antigen 3(LFA-3)の細胞外領域であるCD2結合ドメインとヒトIgG1のFcドメインの融合タンパク質。CD2抗原を表面に発現しているTリンパ球に選択的に結合し、リンパ球の活性化を阻害する。

・Abatacept (Orencia[®])

ヒトCTLA-4の細胞外ドメインとIgG1のFcドメインの融合タンパク質。抗原提示細胞(APC)上に存在するCD80/CD86分子に結合することにより、CD28分子を介したT細胞の活性化が阻害される。

3. 新たな機能性人工タンパク質の創出技術

従来から多くのバイオ研究機関が、特定レセプターへの親和性や選択性に優れた“生理活性タンパク質のアミノ酸置換体(機能性人工タンパク質)”を創製するため、Kunkel法などの点突然変異法を用いた構造変異体(アミノ酸置換体)の作製を精力的に試みている。しかし点突然変異法は、1つ1つのアミノ酸を置換した変異体を作製し、個々の変異体を別々に精製し機能評価しなければならないため、莫大な時間と労力を要するうえ、評価できる変異体の数には実質的に限界があり、有効な変異体の効率的・効果的な作製とはいえなかった。それに対して近年、ファージ表面提示法を利用することにより¹⁹種類以上もの多様性を有した構造変異タンパク質(生理活性タンパク質のアミノ酸置換体)を一挙にCombinatorial Biosynthesisし、この構造変異体ライブラリーの中から、レセプター親和性や特異性などが向上した“機能性人工タンパク質”を迅速かつ効率よくスクリーニングできる基盤技術が開発されている。

ファージ表面提示法を用いたスクリーニングでは、ファージ表面にタンパク質を発現させ、固定化された標的分子と結合するファージを選別する操作を繰り返して、目的の結合特性を示すタンパク質を発現するファージを選択していく。また、選択されたファージを大腸菌に感染させれば、その培養上清中にタンパク質を発現させ、これを用いて、タンパク質の生物活性もハイスループットに評価することが可能である。さらに、培養上清というクルードなサンプルでは必ずしも評価できない発現タンパク質の物理化学的性質や生物学的性質を詳細に解析する必要がある場合には、発現させた変異体タンパク質を精製して評価を行うこともできる。

多数の変異体を評価できるという利点を活かし、

ファージ表面提示法を用いて、従来の方法では見出すことのできなかった構造変異体の探索に成功した例として、腫瘍壊死因子(TNF)のリジン欠損体が報告されている²¹。従来の点突然変異法を用いた構造-活性相関研究では、TNFのLys11やLys65・Lys90はその立体構造(三量体)形成やレセプター結合に必須と報告されていた。TNFに限らず、一般にリジン残基は多くの場合、生理活性タンパク質の高次構造形成やリガンド-レセプター結合などに必須の役割を担っているため、他のアミノ酸への置換は致命的な活性低下を招いてしまうことが、従来までの点突然変異解析によって常識となっていた。しかしファージ表面提示法を用いることで、Lys11やLys65・Lys90を含む全6個のリジン残基を一挙に他の様々なアミノ酸へ置換したタンパク質ライブラリーを構築することが可能となった結果、野生型TNFと同等さらには10倍以上もの生物活性を有するリジン欠損TNFを創製できることが判明した²²。この例では、TNFの6カ所のリジン残基を他の各種のアミノ酸に置換したTNF変異体ライブラリーをファージに導入し、固定化したTNF受容体への結合能を有するTNF変異体を発現しているファージをBiacore[®]を用いて選別、さらに、選別されたファージを感染させた大腸菌の上清を用いたバイオアッセイ(TNF感受性細胞に対する細胞傷害性試験)により、変異体の生物活性を評価している。リジン残基を置換しても活性を保持した変異体が得られた理由としては、リジンから置換されたアミノ酸が、TNFの活性保持に適したアミノ酸であったことが考えられる。従来の点突然変異法を用いた検討では、リジンをアラニンなどのアミノ酸に置換してTNFの活性が失われることを評価しているが、6カ所あるリジン残基をリジン以外のアミノ酸19種類に置換した変異体(19⁹種類)の機能を個別に評価することは現実的でないこともあり、活性を保持したリジン欠損体を見出す試みはなされていなかった。ファージ表面提示法を駆

使用することにより現在までに、TNF受容体サブタイプに選択的に結合する機能性人工TNFや、体内安定性に優れた機能性人工TNFも多数得られており³⁾、今後の研究の進捗に期待が持たれるところである。

このようなファージ表面提示法を利用した機能性人工タンパク質の創出以外にも、ジーン・シャッフリング法や種々糖鎖修飾テクノロジーの開発が広く進められており、今後の“有効かつ安全なタンパク質性医薬品候補”の分子設計に寄与するものと考えられる。

4. 機能性人工タンパク質の品質・安全性確保

タンパク質性医薬品において薬効を期待される作用機構の代表的なものは、生体の恒常性維持機構の中で、本来、時空間的に厳密な発現制御のもとで発現・機能すべきであった当該タンパク質が欠損あるいは質的、量的に変化していることが発症の原因であった場合、あるいは疾患状態で質的、量的に変化したり欠損していくような場合に、これを補うというものである。そのような使用目的で開発されてきたものとしては、ヒトインスリン、グルカゴン、成長ホルモン、インスリン様成長因子、ナトリウム利尿ペプチド、グリコセレブロンダーゼ、エリスロポエチン、顆粒球コロニー刺激因子、血液凝固因子類などが典型的な例として挙げられる。その作用プロファイルがすでにほぼ明らかにされている天然型タンパク質と同等のものとして製造されたタンパク質性医薬品では、必要とされる品質が確保され、投与後の生体内濃度や作用局所さえ適正に制御できれば、一定の安全性を確保できるものと期待される。これに対して、天然のものとは異なる構造を持つ機能性人工タンパク質の品質および安全性の確保のためには、従来までのタンパク質性医薬品で必要とされていた

品質・安全性確保のための方策に加え、機能性人工タンパク質の特性に応じた個別の配慮が必要になる。

タンパク質性医薬品の品質・安全性等を確保するためには、まず申請しようとする製造方法を明らかにする必要がある。そして得られた原薬について、その構造・組成、物理化学的性質、免疫化学的性質、生物学的性質などの分子特性や安定性を最新の解析法を用いて詳細に解析するとともに、目的物質関連物質や目的物質由来不純物(定義については第3章概論およびICH Q6B参照)、製造工程由来不純物などの存在状況、感染性物質が存在しないこと、その他の汚染物質の存在実態等を含めた「品質特性」(定義についてはICH Q5Eを参照)を明らかにすることが必要である。また、製剤の製造方法と「品質特性」についても必要な情報やデータを明らかにする必要がある。その上で、臨床の場に、適切な品質を有する医薬品を恒常的に提供するための品質確保、品質管理の方策を講ずる必要がある。品質確保、管理のキーポイントは非臨床および臨床試験により有効性、安全性が評価された製品の「品質特性」をいかに継続して保証するかということである。その際、製品レベルでのロットごとの試験による保証(適切な規格・試験法の設定)と製造方法での保証(原材料や添加物などの品質管理、重要工程の一定性、プロセス評価・検証、プロセスコントロール・工程内管理試験など)を相互補完的にいかに合理的に組み合わせて品質確保策とするかが最大の課題となる。なお開発段階においては、非臨床および臨床試験により明らかになる有効性・安全性の解析結果と品質との関連を評価・検討し、望ましい品質を確保できるよう製造方法を最適化したり、品質の一定性を確保するための規格・試験法の改定を図ったりすることが必要な場合もある。試験法には、特性解析に用いた分析手法を適切に応用する。製品の安全性評価を行う際には、その「品質特性」から考えられる安全性上の懸念事項につ

いて、特に注意して解析を行う必要があるが、機能性人工タンパク質の場合は、化学修飾により製造される修飾タンパク質の修飾位置異性体の問題、構造改変により目的以外の生物活性が変化している可能性、抗原性の問題、などが特に留意すべきポイントである。

製造工程で PEG 化、デキストランやマンノース等を用いた糖修飾のような化学的改変(化学修飾)を行う場合、人為的に施される PEG 化反応や糖付加反応などはタンパク質の部位特異的に起こるものではないため、1種類あるいは数種類のアミノ酸に、しかも複数カ所に PEG あるいは糖などがランダムに導入される場合が多い。したがって、PEG 化反応あるいは糖修飾後の機能性人工タンパク質は PEG 化あるいは糖修飾された部位、導入された PEG や糖の分子数などにおいて異なる構造を持つ分子種の混合物となり、分子量などを指標に精製された画分についても、修飾位置異性体の混合物となってしまう。したがって、特性解析においては、得られた修飾タンパク質について、分子量、PEG あるいは糖などの結合分子数、PEG あるいは糖などの結合部位、修飾位置異性体の構成比といった構造・組成や物理化学的性質を最新の分析法を用いて明らかにすると共に、修飾位置異性体ごとの生物学的性質についても可能な範囲で詳細な解析を行う必要がある。修飾位置異性体ごとに作用プロファイルが異なる場合、修飾位置異性体の混合物は機能面(生物活性、体内挙動)から見ても不均一な機能分子の集団となり、そのために修飾位置異性体の構成比が有効性および安全性に影響を及ぼす可能性がある。実際、PEG 化インターフェロンでは、PEG の修飾位置異性体ごとに抗ウイルス活性が異なることが報告されている。また、修飾位置異性体の構成比が異なるロット間では体内動態も異なるとされている。修飾タンパク質における修飾位置異性体の解析手法としては、例えば、液体クロマトグラフィーにより異性体を分離し、それぞれのピークについて、

ペプチド分析、アミノ酸配列分析、質量分析などを行うことによって、修飾部位を同定することが可能である。また、液体クロマトグラフィーの溶出パターンから異性体の構成比が分かるため、ピーク強度比を規定することで、異性体構成比の一定性が確保できる。

ここで重要なことは、前臨床、臨床試験に供した製品が、どのような不均一な分子種の集団であったか、不純物プロフィール等を明らかにすることである。前臨床、臨床試験を通して不均一性のパターンや不純物プロフィールなどの品質特性の変動がどのような範囲内であったか、その品質特性プロフィールの変動が有効性、安全性にどのように影響を及ぼしたかを精密に観察する必要がある。その結果、有効性、安全性に影響を及ぼすことがなかった品質特性プロフィールの変動の範囲が、以降、維持管理すべき製品の品質特性プロフィールの変動の範囲ということになる。当然、異性体構成比の一定性の確保や目的物質関連物質、主要な不純物に関する試験方法および規格値・判定基準は、製品の規格および試験方法の必須の項目とする必要がある。化学修飾を行う場合に製品に混入する可能性のある不純物については、製造工程由来不純物として、PEG 化反応や糖付加反応などの工程で用いられる試薬やその変化物を評価項目に加える必要がある。また、目的物質由来不純物として、非結合型となった遊離のタンパク質、PEG が目的とする分子数以上に結合した di-あるいはオリゴ PEG 変異体、O- 結合型 PEG 修飾体、凝集体が混在する可能性を評価して、必要に応じて許容量に関する規格を設定すべきである。目的物質の脱アミド体や酸化体も多くのタンパク質性医薬品では、留意すべきものである。これらが、目的物質に匹敵する生物活性と安全性を有していれば目的物質関連物質として有効成分の一部を構成するが、目的物質に匹敵しない場合は目的物質由来不純物となる。

修飾反応条件が修飾部位異性体の構成比に大き

く影響し、原薬の生物活性にも影響を与える可能性が考えられることから、製品の品質の一定性を確保するためには、PEGあるいは糖など修飾条件、精製工程などは厳密に工程管理されなければならない。また、工程管理の中では、PEGあるいは糖鎖など付加反応に用いられる各種試薬の品質管理なども必要であろう。最終製品の規格および試験方法で不均一性を含む製品の品質特性プロフィール全体をカバーした十分な試験が実施できないときには、修飾条件、精製工程の工程管理や各種試薬の品質管理をより厳密に行うことで総合的に製品の品質とその恒常性を保証する必要がある。

機能性人工タンパク質の生物学的性質に関しては、天然に存在するタンパク質からの構造改変により目的以外の生物活性が変化している可能性があるため、慎重な検討が必要である。改変により意図しない変化が生じた例として、持続型のインスリン改変体であるインスリングラルギンでは、インスリン受容体との親和性はインスリンと差異がないものの、インスリン様成長因子 IGF-1 受容体との結合親和性がインスリンの6~8倍であると報告されている⁷⁾。げっ歯類を用いた24ヵ月間反復投与の発がん性試験により、インスリングラルギンは発がん性を有しないと判断されているが、IGF-1受容体への高親和性結合と安全性との関連の全貌が必ずしも明らかにされたとは言えない。このような特性を持つ機能性人工タンパク質で従来の製品より医薬品としてより有用と目されるもの場合には承認を可とされたとしても、市販後安全対策(ファーマコビジランスプランニング)をしっかりとたて、市販後調査などにより安全性を慎重に観察していく必要がある。ちなみに、医薬品として実用化されているものではないが、B鎖10番目のHisをAspに置換し、インスリン受容体との親和性が亢進した改変インスリンでは、ラットで乳腺腫瘍の発生が報告されている^{8),9)}。1アミノ酸の置換により発がん性が生じることを示した典型例であり、改変による生物学的性質の

変化が安全性に大きく影響する可能性があることを認識する必要がある。

機能性人工タンパク質の免疫原性・抗原性についても注意深い観察が必要である。一般にPEG化タンパク質の場合には免疫原性・抗原性が減弱すると言われている。一方、アミノ酸置換体などの改変タンパク質の場合に必ず懸念されるのが、免疫原性および抗原性の問題である。タンパク質性医薬品の免疫原性や抗原性は、タンパク質の一次構造上の特徴はもとより、高次構造、製剤中の目的物質の凝集体や製造工程由来不純物、添加剤、あるいは投与経路などにも大きく影響される⁷⁾。通常ヒト型組換えタンパク質性医薬品でも免疫原性や抗原性が問題になる例があるが⁹⁾、もともとヒトには存在しない機能性人工タンパク質の場合には、その免疫原性・抗原性により一層の注意を払わねばならない。ただし、がんなどのように宿主の免疫機能が低下している患者への機能性人工タンパク質の適用と、免疫機能が過剰に亢進しているアレルギーやリウマチといった炎症性疾患への適用では、異なった免疫原性・抗原性問題への取り組みやその評価基準が必要であると考えられる。またヒトに対する抗原性は一般に動物実験では評価できず、非臨床試験における評価は困難であるため、ヒトでの抗原性の予測についての方法論の確立などが望まれるところであるが、当面は治験中や市販後における注意深い臨床観察がなによりも重要であると考えられる。

5. おわりに

本節では、昨今加速度的に創出されつつある機能性人工タンパク質の品質・安全性評価の観点から、現状と将来展望、課題について論じた。ゲノミクス、トランスクリプトミクスやプロテオミクス、グライコミクス、メタボロミクスといった大規模な網羅的解析および高効率高発現・標的細胞

指向性のある遺伝子導入技術や発現制御技術、特異的評価系などによる個々の遺伝子やタンパク質の機能解析により、疾患の治療に関わるタンパク質(医薬品シーズ・タンパク質)の探索・同定が進展し、今後益々、機能性人工タンパク質が、種々の難治性疾患に対する有用な治療薬として開発の対象となることが期待される。一方で、ウイルスや細菌のゲノム解析等の進歩も相俟って、より効率よく宿主の免疫機能を活性化したり、メモリー機能を亢進させたりするような新興・再興感染症に対する機能性人工ワクチン(抗原タンパク質)の登場も予想される。機能性人工ワクチンの場合、免疫原性・抗原性そのものが薬効となる一方で、非特異的免疫の活性化や精緻に構築されている生体免疫機構を乱すことによる思わぬ副作用が発現する可能性に十分な注意が必要となる。また、分子特性・品質特性、用法・用量や投与期間など考慮しつつ、必要に応じて上述した機能性人工タンパク質の品質・安全性確保上の課題をクリアする必要があると思われる。

参考文献

- 1) Kurtzhals P., Schaffer L., Sorensen A., Kristensen C., Jonassen I., Schmid C. and Trub T.: Correlations of receptor binding and metabolic and mitogenic potencies of insulin analogs designed for clinical use. *Diabetes*, 49: 999-1005, 2000.
- 2) Yamamoto Y., Tsutsumi Y., Yoshioka Y., Nishibata T., Kobayashi K., Okamoto T., Mukai Y., Shimizu T., Nakagawa S., Nagata S. and Mayumi, T.: Site-specific PEGylation of a lysine-deficient TNF-alpha with full bioactivity. *Nat. Biotechnol.*, 21: 546-552, 2003.
- 3) Shibata H., Yoshioka Y., Ikemizu S., Kobayashi K., Yamamoto Y., Mukai Y., Okamoto T., Tanai M., Kawamura M., Abe Y., Nakagawa S., Hayakawa T., Nagata S., Yamagata Y., Mayumi T., Kamada H. and Tsutsumi, Y.: Functionalization of tumor necrosis factor-alpha using phage display technique and PEGylation improves its antitumor therapeutic window. *Clin. Cancer Res.*, 10: 8293-8300, 2004.
- 4) Walsh C.: Therapeutic insulins and their large-scale manufacture. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 67: 151-159, 2005.
- 5) Dideriksen L. H., Jorgensen L. N. and Drejer, K.: Carcinogenic effect on female rats after 12 months administration of the insulin analogue B10 ASP. *Diabetes*, 41: 143A, 1992.
- 6) Drejer K.: The bioactivity of insulin analogues from *in vitro* receptor binding to *in vivo* glucose uptake. *Diabetes Metab. Rev.*, 8: 259-285, 1992.
- 7) Schellekens H.: The immunogenicity of biopharmaceuticals. *Neurology*, 61: S11-12, 2003.
- 8) Schellekens H. and Casadevall N.: Immunogenicity of recombinant human proteins: cause and consequences. *J. NeuroL*, 251 (Suppl 2): II/4-II/9, 2004.

(堤 康央/石井明子/早川堯夫)

細胞内薬物導入キャリアとしての細胞内移行ペプチドの応用技術

向 洋平・堤 康央・中川晋作

要旨

細胞内移行ペプチド (protein transduction domain : PTD) は、タンパク質や核酸、ナノ粒子といった高分子医薬を効率的に細胞内へと導入可能であることから、細胞内への物質導入技術として注目を集めている。本稿では、実際に筆者らが行った PTD の特性評価から得られた知見を紹介したうえで、現在世界で試みられている PTD の応用例を概説する。また後半部では、PTD の応用範囲をさらに拡大するための技術として、PTD と fusogenic peptide を併用した際の細胞質内への物質導入の効率化、ならびに細胞内導入活性に優れた新規 PTD の創製研究に関して述べる。

キーワード

細胞内移行ペプチド (PTD)、DDS、ファージ表面表示法、ペプチドライブラリー、HIV-1 Tat、fusogenic peptide、オルガネラターゲティング、細胞内薬物治療

I. 背景

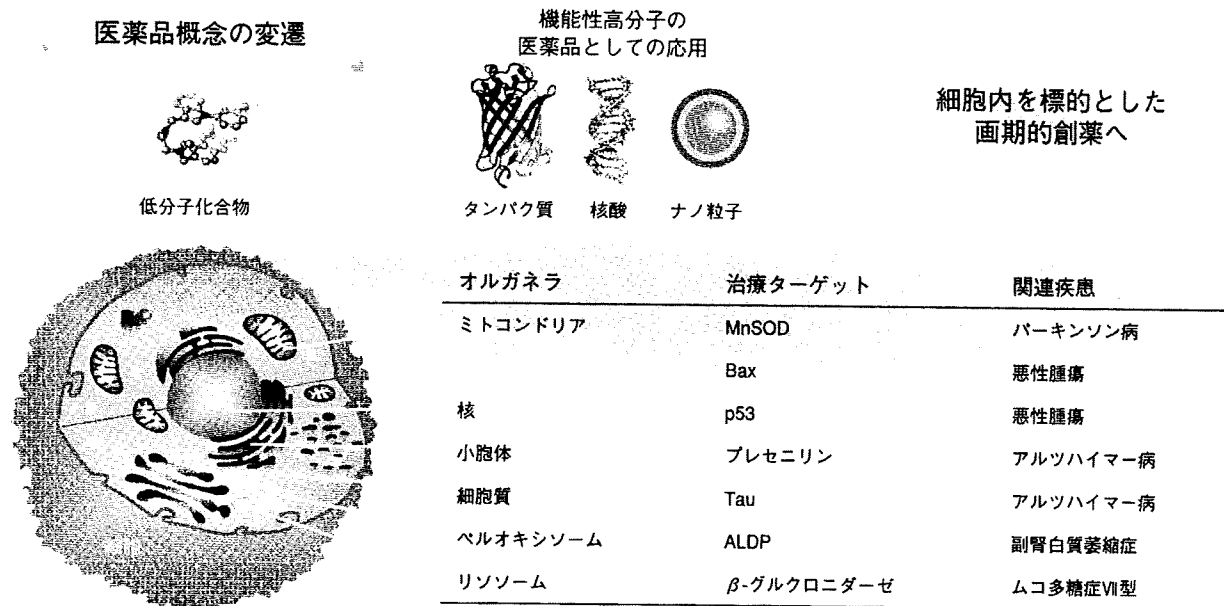
近年の医薬品概念のパラダイムシフトに伴い、医薬品は低分子有機化合物であるという固定概念はなくなり、癌に対する抗体分子をはじめとする生理活性タンパク質や各種核酸といった機能性高分子医薬が疾病の治療・診断へ応用されている。多くの難治性疾患の発症は、遺伝的あるいは外的要因によってタンパク質の機能や発現に異常が生じ、体内の恒常性が破綻することにより起こるため、それら治療標的タンパク質の機能を直接的に制御可能な上記医薬品は、21世紀型医薬品として、その開発に世界的な期待が寄せられている。しかしながら、上市されているこれらの医薬品の治療ターゲットの多くは「細胞外」の可溶性分子やレセプターに限局されてしまい、「細胞内」への展開はいまだ研究途上であると言わざるをえない。したがって、21世紀型医薬としての機能性高分子の治療適用範囲を「細胞内」へと拡大した新たな機能性高分子製剤の開発が待望されている。

1つの正常細胞を構成するタンパク質は10億にもほり、その多くが細胞内で機能しているという事実から、

一般的に数多くの治療ターゲットが細胞内に潜んでいる可能性が示唆されている。実際に、近年のタンパク質研究の進展に伴い、癌における転写因子や、アルツハイマー病をはじめとする神経変性疾患におけるミトコンドリア酵素など、各種難治性疾患の原因タンパク質が細胞内の特定オルガネラに存在し、その機能を発揮していることが明らかとなりつつある(図1)。したがって、今後の医薬品開発では、細胞内を標的とした薬物治療戦略がますます注目されていくものと考えられる。しかしながら、このような細胞内疾患関連タンパク質を治療標的とした場合、高分子製剤特有の問題点により、その実用化は極度に制限されてしまう。それは、一般的にタンパク質、核酸などは、高分子量かつ水溶性であるため、脂質二重膜から構成される細胞膜を通過し細胞内へ侵入できないことに起因する。したがって、細胞内タンパク質をターゲットとした新規治療戦略を実現するためには、タンパク質、核酸などの高分子医薬を、活性を保ったまま細胞内へと導入できる技術が必要不可欠である。

このような背景の下、近年、protein transduction domain (PTD) と呼ばれるペプチドが、細胞外から細胞内へと

図1 細胞内治療ターゲットに対する薬物療法とPTDの応用技術



しかしながら、高分子医薬は、

- 細胞膜透過性が乏しく細胞内の治療標的への到達が困難



細胞内移行ペプチド (PTD) の応用

- 細胞内への効率的な薬物導入
- 細胞内の治療標的への薬物送達

細胞内の特定オルガネラには数多くの疾患関連タンパク質が含まれており、難治性疾患を根治可能な高分子医薬の細胞内適用が望まれている。そこで、膜透過性が乏しい高分子医薬の細胞内送達をめざし、細胞内移行ペプチド (PTD) の応用が注目されている。

移行する活性を有することが見出され、これらを細胞内薬物導入キャリアとして応用しようとする試みに注目が集まっている。HIV-1由来のTatペプチドに代表されるPTDは、塩基性アミノ酸を多く含む配列を有することを共通点とし、タンパク質、核酸、ナノ粒子などの様々な高分子物質を、その活性を保持したまま細胞内へと送達できることが知られている。また、従来までの物質導入法であるカチオンリポソーム法などのトランスフェクション試薬や、エレクトロポレーションなどの直接導入法などと比較して、一般に高効率で細胞内への物質導入が可能であるという利点を有していることから、そのキャリアとしての利用に大きな期待が寄せられている。

II. Protein Transduction Domain (PTD)

PTDに関する研究は、1988年にGreenやFrankelらに

よってHIV-1の転写因子であるTatタンパク質が、細胞外から細胞内への移行活性を有していることが見出されたことに始まる。1990年代に入ると、Tatの細胞内移行活性は、タンパク質分子内の塩基性に富む十数個のアミノ酸配列によって担われていることが明らかにされた。さらにその後の研究により、このペプチド配列を結合させれば、Tat以外のタンパク質をも生細胞内に導入できることが発見され、このペプチド配列はprotein transduction domain (PTD) と呼ばれるようになった。現在では、Tatペプチドと同様に細胞内移行活性をもつ、ショウジョウバエ・ホメオドメインのAntennapedia由来ペプチド (Antp)、HIV-1のmRNA核外輸送タンパク質Rev由来ペプチド (Rev)、単純ヘルペスウイルスの構造タンパク質N末端由来のVP22ペプチド (VP22) などがPTD活性を有することが報告されており¹⁾(表1)、細胞内への薬物導入キャリアとしての応用に大きな期待が寄せられている。これらPTDに共通してみられる特徴は、

表① 代表的な PTD とそのアミノ酸配列

PTDの代表例	由来	配列 (R,K,H: 塩基性アミノ酸)
Tat	HIV-1	GRKKRRQRRRPQ
Antp	<i>Drosophila</i>	RQIKIWFQNRRMKWKK
Rev	HIV-1	TQRARRNRRRRWRERQR
VP22	HSV	NAKTRRHERRRKLAIER

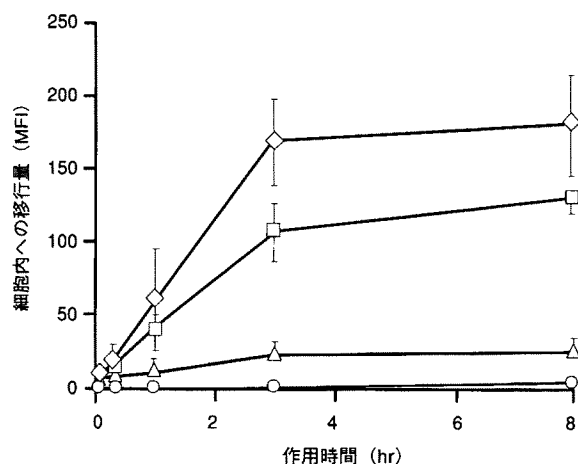
アルギニンやリジンといった塩基性アミノ酸が配列中に多数みられることであり、アルギニンのみを7~十数個、人工的に連結したポリアルギニン配列にも PTD 活性があることが明らかにされるなど²⁾、PTDの塩基性が細胞内移行に重要な役割を担っているものと考えられている。実際にわれわれの行った検討においても、PTDの細胞内移行活性にこのような塩基性アミノ酸の重要性を示すデータが得られており(図②)、そのアミノ酸配列よりもアミノ酸組成が重要である可能性が強く示唆されている。

図②では、HeLa細胞に対し、FITCラベルしたペプチドを添加し、細胞内への取り込みをフローサイトメトリーにより評価した結果を示している。PTDの代表例である Tat ペプチド、ならびに Tat ペプチド内のアミノ酸配列をランダムに組み換えた Tat スクランブルペプチドでは、3時間以内に大多数のペプチドが取り込まれ、レセプター依存性エンドサイトーシスにより効率的に細胞内に取り込まれる RGDS ペプチドよりも、さらに優れた細胞内移行活性を有することがわかる。とりわけ、Tat ペプチドには劣るものの、Tat スクランブルペプチドが優れた細胞内導入効率を有するという事実は興味深く、本知見は PTD の細胞内への導入に、その PTD の塩基性、すなわちアミノ酸組成が重要であるという先の可能性を裏づけるものである。

Ⅲ. PTD の応用例

これまでに細胞内で機能する活性タンパク質を PTD を用いて細胞内へと導入し、疾病治療へと応用しようとする試みは多数報告されている。表②には、数ある PTD の応用研究の中から、*in vivo* への適用に成功した例を記載した³⁾⁻¹³⁾。最も例が多いのは、癌に対する応用であり、細胞死を誘発するペプチドやカスパーゼといったタンパク質、あるいは癌免疫療法をめざした細胞内への抗原デリバリーが盛んに行われている。また、逆に Bcl-xL をはじめとする細胞死抑制分子を用い、脳虚血再灌流障害の

図② HeLa 細胞に対する Tat ペプチドの細胞内移行特性



FITC 修飾した各種ペプチドの細胞内移行を、フローサイトメトリーにより解析した。その結果、Tat ペプチド (◇)、Tat スクランブルペプチド (□) は、レセプター依存性エンドサイトーシスで取り込まれる RGDS ペプチド (△)、ネガティブコントロールの FITC デキストラン (○) に比べ、有意に細胞内移行活性が優れていることがわかる。なお、各種ペプチドのアミノ酸配列は以下のとおりである。Tat ペプチド: GRKKRRQRRRPQ, Tat スクランブルペプチド: RPGRQRPRKQKRR, RGDS ペプチド: RGDS。

軽減をめざす研究¹²⁾では、現在でも多様な細胞死抑制因子を用いた報告がなされている。

PTD の利点として忘れてはならないのは、タンパク質やペプチドにとどまらず様々な高分子を細胞内へと導入することができることであろう。2000年に Lewin らによって報告された手法は、PTD を基礎研究へも応用展開できることを示している。彼らは、Tat ペプチドで標識した超常磁性酸化鉄ナノ粒子を投与し、造血幹細胞や神経前駆細胞をラベルすることに成功している¹³⁾。酸化鉄ナノ粒子でラベル化された細胞は、生体内で正常に分化し、その分布は MRI によってイメージングが可能である。現在、本方法は様々な幹細胞の *in vivo* での動態を追跡する手法として応用されている。

PTD の応用技術は、細胞内への物質輸送だけにとどまらず、生体バリアを乗り越えるためのツールとして応用する試みも存在する。2000年には Rothbard らによりポリアルギニン:R7 とシクロスポリンを結合させることで、皮膚における抗炎症効果を増強したという報告がなされた⁸⁾。その作用増強メカニズムは明確ではないが、まず細胞内へと取り込まれた PTD 融合体の一部が、組織内

表② PTDの *in vivo* への適用例 (文献3~13より)

治療標的・応用	導入分子(Cargo)	PTD	文献
腫瘍	PKC δ inhibitory peptide	Tat	3
腫瘍	Caspase-3 fusion protein	Tat	4
腫瘍 (ワクチン)	OVA CTL peptide	Antp	5
腫瘍 (DC ワクチン)	OVA	Tat	6
炎症	IKK β C-terminal peptide	Antp	7
炎症 (皮膚)	Cyclosporin A	R7	8
PNP 欠損症	Purine nucleoside phosphorylase	Tat	9
ポリグルタミン病	polyQ binding peptide 1 (QBP-1)	Tat, VP22 etc.	10
神経細胞死	GDNF	Tat	11
脳虚血再灌流障害	Bcl-xL	Tat	12
細胞動態トレース	超常磁性ナノ粒子	Tat	13

部へと浸透しえたことによるものであると考えられている。本概念によって、現在では経口投与製剤開発において、小腸上皮細胞といった生体バリアを乗り越えるための DDS ツールとしての PTD の応用にも注目が集まっている。

しかしながら、このような成功例が存在する一方で、PTD を利用した現存の応用研究のほとんどは *in vitro* での検討にとどまり、表②に示したような *in vivo* への適用はごくわずかに限定されてしまっている。それは、PTD の応用範囲は細胞内に微量存在することにより機能を発揮する分子に限られていること、つまり細胞内に高濃度存在させなければ十分な効果を発揮しえない分子への応用は、現存する PTD の細胞内導入効率では不十分であることが一因と考えられている。そのような現状を打破するためには、PTD の細胞内移行メカニズムを詳細に理解し、その物質導入を改良しうる方法論の開発が必須であると考えられる。

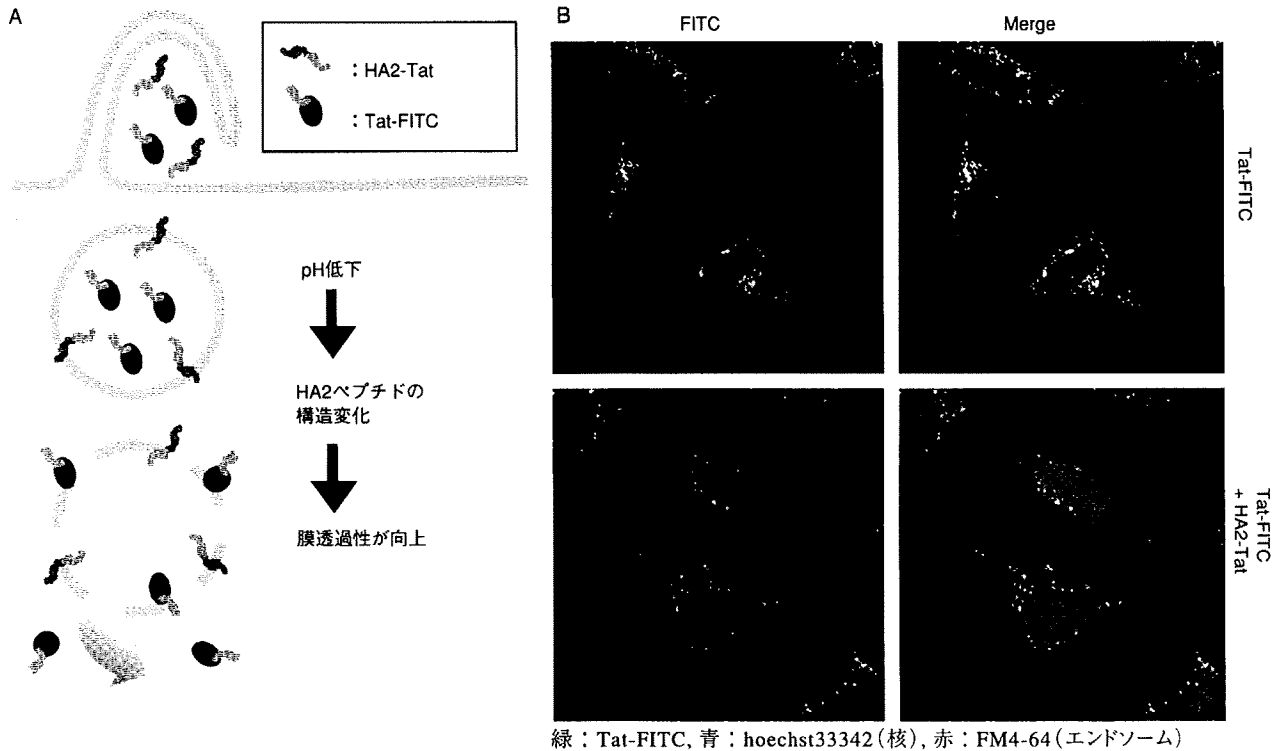
著者らは、このような細胞内移行メカニズム解析の一環として、Tat-FITC の細胞内導入後の挙動を共焦点レーザー顕微鏡で観察した (図③)。その結果、細胞内に取り込まれた Tat-FITC は、大部分はエンドソーム内にトラップされ、そのほとんどが治療標的の存在する細胞質や標的オルガネラへと到達しえないということが明らかとなった。したがって、標的オルガネラへの効率的な薬物送達を達成し、PTD を *in vivo* への適用にかなうツールとして応用していくためには、① PTD の細胞内挙動を理解し、エンドソームからの効率的なエスケープを達成すること、② PTD の細胞内導入活性自身を強化することで、細胞内取り込みの絶対量を増大させること、とい

った PTD の有効性向上に関するアプローチを融合することが有効であるものと考えられる。以上の背景を踏まえ、次項からは、われわれが行ってきた PTD の有効性向上をめざした2つの基盤技術開発について紹介する。

IV. PTD の有効性向上 -HA2 ペプチドによるエンドソームからのエスケープ-

HA2 ペプチドは、インフルエンザウイルス表面に存在する感染に必須のタンパク質、HA タンパク質由来であり、fusogenic peptide として知られている。インフルエンザウイルスが細胞内に侵入する際には、HA タンパク質はエンドソーム内の酵素によって HA1 と HA2 の2つのフラグメントに切断され、HA2 フラグメントの働きによってエンドソーム膜の透過性が亢進し、ウイルス粒子の効率的な細胞質内への侵入が促進される。最近の研究によって、この HA2 フラグメントの N 末端ペプチド配列 (influenza HA2 peptide) は、エンドソーム内低 pH 環境下で構造変化を生じ、それによって膜透過性を向上させることが明らかとされた¹⁴⁾。著者らは、HA2 と Tat の融合体 HA2-Tat を利用し、モデル薬物としての Tat-FITC と同じエンドソーム内へ取り込ませることで、これらの効率的な細胞質内への送達が可能になるものと考えた (図③)。まず、Tat-FITC と HA2-Tat ペプチドを同時に HeLa 細胞に作用させ、その細胞内挙動を共焦点レーザー顕微鏡で観察した。Tat-FITC 単独作用では、FITC 由来の蛍光 (緑) がドット状に観察されたのに対し、HA2-Tat ペプチドを共存させると、その蛍光が核を含めた細胞全体に拡散し

図3 Influenza HA2 ペプチドを用いた Tat-FITC のエンドソームからのエスケープ



A. HA2 ペプチドは、低 pH 環境下で構造変化を起こし、エンドソーム膜の透過性を向上させる。
 B. Tat-FITC 単独作用群 (上段) では、そのほとんどがエンドソームにトラップされてしまうのに対し、HA2 ペプチドを共存させた群 (下段) では、Tat-FITC が細胞全体に分散していることがわかる。 (グラビア頁参照)

て観察された。本方法論は、細胞質内への積極的な薬物送達という観点から、細胞質や特定オルガネラを標的とした薬物治療の有効性を向上可能なアプローチとなるものと期待される。

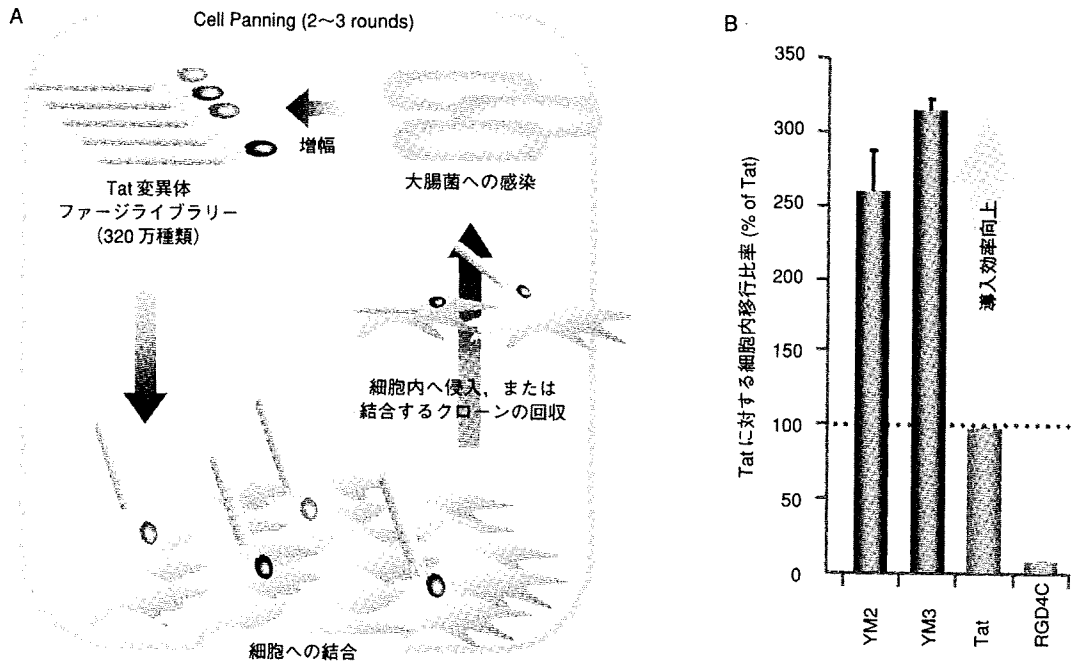
V. PTD の有効性向上 - ファージ表面提示法を用いた新規 PTD の創製 -

PTD による物質導入の高効率化で最もシンプルなアプローチは、PTD 自身の細胞内導入活性を向上させることであろう。そのため、優れた PTD の開発をめざして、現在世界的に PTD の立体構造解析に基づいたアナログ作製や細胞への吸着性向上を目的としたカチオン性アミノ酸導入体の作製が、ペプチド合成法によりトライアンドエラーで進められている¹⁵⁾。しかしながら、これらの方法は膨大な時間・労力を費やすばかりか、作製可能なペプチドの多様性 (種類) にも限界があるなど、期待通りの PTD はほとんど得られていない。以上の背景か

ら著者らは、ファージ表面提示法を駆使することで、その細胞親和性・特異性や細胞内移行性といった機能をハイスループット解析できるテクノロジーの開発を試みている。

ファージ表面提示法は、数百万から数十億種類ものタンパク質ライブラリーをファージ表面へと再現する技術であり、その膨大な変異体の中から、活性増強、特異性の変化といった分子進化を遂げた機能性変異体をわずか 1~2 週間という短期間にスクリーニングする手法である¹⁶⁾。著者らは、Tat 配列中のアルギニンがその細胞内移行に重要な役割を担っていることに着目し (図 2), アルギニン以外の 5 つのアミノ酸をランダム化した Tat ペプチドライブラリー (20⁵ = 3,200,000 種類) を構築することで、野生型 Tat ペプチドよりも細胞内移行活性に優れた新規 PTD を得ようと試みた¹⁷⁾。作製したファージライブラリーを培養細胞へと添加し、細胞へ結合あるいは細胞内へ侵入したファージを回収し再度大腸菌に感染させることによって、ファージを増幅した (図 4)。こ

図4 ファージ表面提示法を駆使した新規 PTD の創製技術



A. Tat ペプチド配列中5つのアミノ酸をランダムに改変した Tat ライブラリーの多様性は320万種類以上に及ぶ。これらの中から細胞に結合、または細胞内に取り込まれるクローンのみを選択・増幅する cell panning を2~3回繰り返すことによって、効率的に細胞内に移行する Tat 変異体をスクリーニングした。

B. 得られた Tat 変異体の中には、3倍以上の効率で細胞内に移行する新規 PTD が含まれていた。

(グラビア頁参照)

のような一連の cell panning を2~3回繰り返したファージプールの中には、効率的に細胞内に取り込まれる新規 PTD を表面提示したファージクローンが含まれているはずである。実際に得られたクローンの中には、図4Bで示すような、野生型 Tat よりも3倍以上効率的に細胞内に取り込まれるクローンが含まれていた。現在、本方法論のさらなるシステムアップをめざし、さらに細胞内移行活性に優れる、あるいは細胞特異性を有する新規 PTD の創製などへと、本テクノロジーを応用展開してゆく予定である。

おわりに

PTD は発見されてから10年以上の歴史をもち、古くから多くの研究者がその応用を試みてきた。しかしなが

ら、近年の PTD 基礎研究の進展により、PTD の細胞内移行メカニズムが徐々に明らかになるにつれて、現存する PTD の有効性をさらに向上するアプローチも可能となりつつある。今回の総説では、エンドソームからのエスケープを促すこと、新規 PTD を創製することの双方によって、PTD の有効性向上をめざすアプローチを紹介した。今後は、これら2つの異なるアプローチを融合することで、さらなる有効性の向上をめざす予定である。また将来的には、このような研究をシステムアップすることで、細胞特異性や標的指向化といったわれわれの望む機能を付与した新規 PTD を人工的に作り出すことも可能となるかもしれない。本稿で紹介した技術開発が、今後の細胞内タンパク質を治療標的とした新規 DDS 製剤の誕生への一助となることを期待し、本稿の結語とする。

参考文献

- 1) Dietz GP, Bahr M : Mol Cell Neurosci 27, 85-131, 2004.
- 2) Futaki S, et al : J Biol Chem 276, 5836-5840, 2001.
- 3) Datta K, Sundberg C, et al : Cancer Res 61, 1768-1775, 2001.
- 4) Harada H, Hiraoka M, et al : Cancer Res 62, 2013-2018, 2002.

- 5) Pietersz GA, Li W, et al : Vaccine 19, 1397-1405, 2001.
- 6) Shibagaki N, Udey MC : J Immunol 168, 2393-2401, 2002.
- 7) May MJ, D'Acquisto F, et al : Science 289, 1550-1554, 2000.
- 8) Rothbard JB, et al : Nat Med 6, 1253-1257, 2000.
- 9) Toro A, Grunebaum E : J Clin Invest 116, 2717-2726, 2006.
- 10) Popiel HA, Nagai Y, et al : Mol Ther 15, 303-309, 2007.
- 11) Kilic U, Kilic E, et al : Neurodegener Dis 1, 44-49, 2004.
- 12) Cao G, et al : J Neurosci 22, 5423-5431, 2002.
- 13) Lewin M, et al : Nat Biotechnol 18, 410-414, 2000.
- 14) Han X, Bushweller JH, et al : Nat Struct Biol 8, 715-720, 2001.
- 15) Ho A, Schwarze SR, et al : Cancer Res 61, 474-477, 2001.
- 16) Mukai Y, Yoshioka Y, et al : Comb Chem High Throughput Screen 8, 145-152, 2005.
- 17) Mukai Y, et al : Biol Pharm Bull 29, 1570-1574, 2006.

●向 洋平

- 2002年 大阪大学薬学部総合薬学科卒業
大阪大学大学院薬学研究科博士前期課程進学
- 2004年 同博士後期課程進学
- 2006年 同特任助手
独立行政法人医薬基盤研究所協力研究員（創薬
プロテオミクスプロジェクト）
- 2007年 大阪大学大学院薬学研究科特任助教

学生時代より「フェージ表面提示法を駆使した機能性人工タンパク質の創製」をキーワードとし、サイトカインの改変、抗体、ペプチドの高機能化によるタンパク性医薬品の品質向上をめざした研究を行ってきた。また現在では、得られたアミノ酸改変体に関するX線結晶構造解析も同時に推進することによって、アミノ酸改変により得られた新機能とその構造との関連評価についても検討中である。

第1節 アデノウイルスベクター

はじめに

本稿では、遺伝子治療用ベクターとしてのアデノウイルスベクターの諸性質、現状を紹介しながら、本ベクターの品質・安全性上の課題、および従来型アデノウイルスベクターの欠点を克服し、近き将来で遺伝子導入効率のよい次世代アデノウイルスベクターの開発状況について解説する。

1. アデノウイルスの性質と構造

1953年、小児の扁桃腺やアデノイド組織培養液中から分離されたアデノウイルスは、現在までヒト・トリ・ウシ・サル・イヌ・マウス・ブタを宿主とする80以上の血清型の存在が明らかにされている。ヒト型ではこれまでに51種類の血清型が発見されており、遺伝子治療のベクターとして用いられているのは、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)である。臨床的には小児期に急性気道炎、角結膜炎、膀胱炎などを起こすウイルスである。米国では、約30年以上もの間、約100万人の兵士に対してワクチンとしてアデノウイルスが投与され、重要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、12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。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型における受容体)に結合し¹⁾、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²⁾。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よく起こり、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^{3), 4)}。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など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。

ヒトアデノウイルスは約36 kbの線状二本鎖DNAをゲノムとして持ち、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1A)。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。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タンパク質をトランスに供給できる細胞株である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

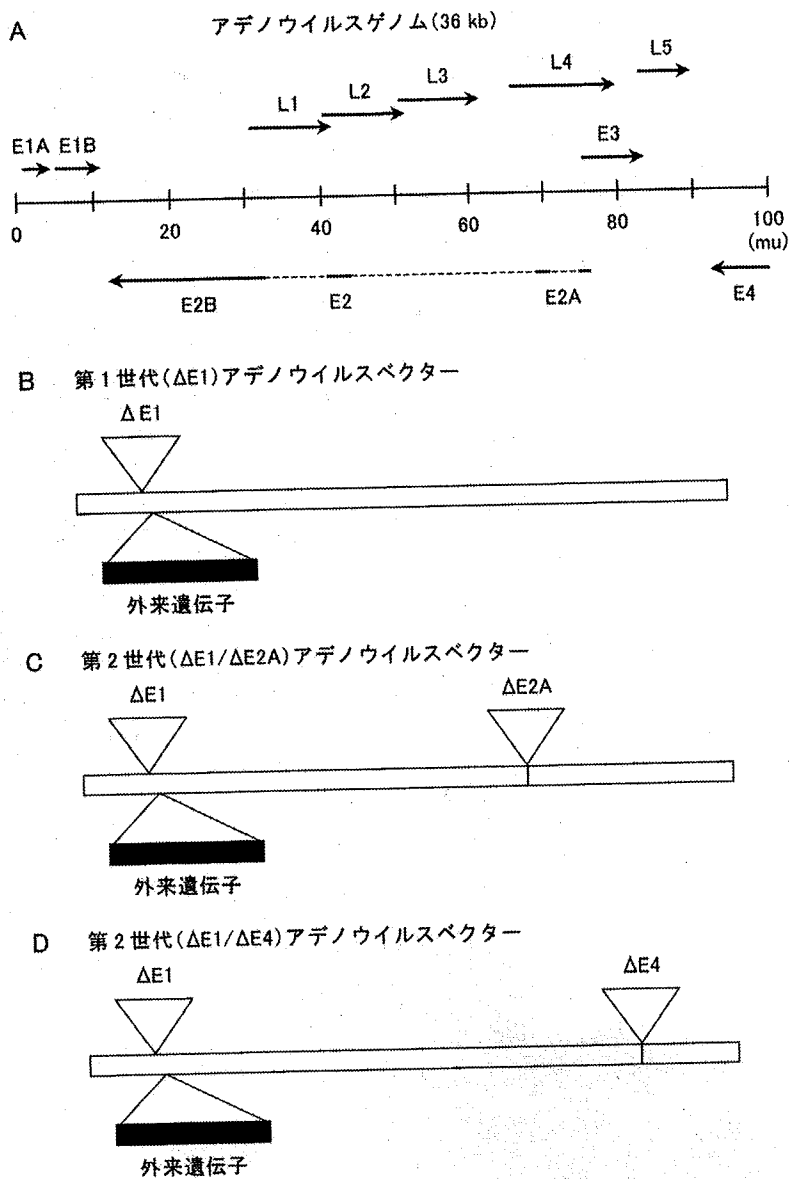


図1 アデノウイルスの遺伝子構造と第1世代・第2世代アデノウイルスベクター

- A. アデノウイルスの遺伝子構造
初期遺伝子領域の E1, E2, E3, E4 と後期遺伝子領域の L1, L2, L3, L4, L5 の転写単位を示した。ウイルス DNA を 0-100 のマップ単位(mu)で表した。
- B. 第1世代(E1欠損型)アデノウイルスベクター
- C. 第2世代(E1欠損/E2A欠損型)アデノウイルスベクター
- D. 第2世代(E1欠損/E4欠損型)アデノウイルスベクター
- 注) 第1・第2世代のベクターとも、E3領域も除かれることが多い。

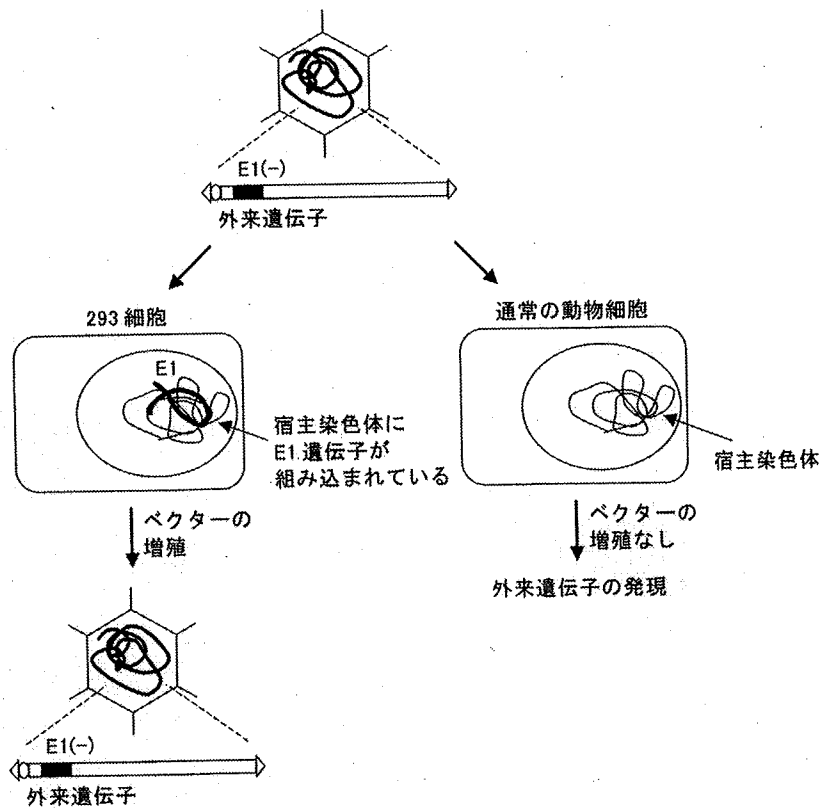


図2 非増殖型アデノウイルス

り、E1 遺伝子を含むアデノウイルス DNA の一部を持っている) などで増殖させる。したがって、E1 領域を欠損したベクターは、理論上 E1 遺伝子産物を発現していない通常の細胞では増殖できず、増殖不能ウイルスとなる(図2)。また、E3 領域はウイルスの増殖には必須ではないため、外来遺伝子の挿入サイズの上昇を目的に除かれることが多い。アデノウイルスは野生型ゲノムサイズの 100% までのゲノムをカプシド内にパッケージングすることができるため、E1 および E3 領域を欠損することにより、最大約 8.1 kb までの外来遺伝子を挿入できるベクターが開発されている^{5), 6)}。

2. 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の特徴としては以下のようなことが挙げられる。1) 種を問わず多くの種類の細胞に遺伝子導入でき、既存のベクターの中では最も遺伝子導入効率のよいものの1つである。培養細胞に感染させた場合には、初代培養細胞を含めてほとんどの細胞で 100% の効率で外来遺伝子を発現させることができる。2) 増殖停止期の細胞に対しても効率よく遺伝子導入できる。3) *in vivo* の組織への直接の遺伝子導入にも適している。例えば、本ベクターをマウスやラットに静脈内投与すると 90% 以上のベクターが肝臓に移行し、100% の肝細胞で外来遺伝子の発現がみられる。また、脳や腫瘍、筋肉などの組織に直接投与する

と、局所での効率のよい外来遺伝子の発現が得られる。4) 高タイター (10^{11} PFU/mL 以上) のウイルスが比較的容易に得られる。5) 物理化学的に安定であり遠心により濃縮が可能である。6) 比較的大きな外来遺伝子 (最大約 8.1 kb) を挿入できる。7) ウイルスゲノムは核内では染色体外 DNA として存在し、宿主の染色体に組み込まれる頻度は低い。そのため、遺伝子毒性 (外来遺伝子が宿主染色体に組み込まれることによる細胞の癌化など) を引き起こす可能性が極めて低い。これは逆に、分裂が盛んな細胞においては導入コピー数は分裂ごとに希釈されることを意味する。一方、分裂停止期の細胞においては数週間から数ヶ月間の持続した遺伝子発現がみられる。したがって、一般的にはアデノウイルスベクターは“持続性の長い一過性の発現ベクター”と考えられている。

これらの性質により、アデノウイルスベクターは単に遺伝子治療のための有望なベクターというだけでなく、動物個体の組織で目的遺伝子を直接発現させてその機能を解析したり、ヒトゲノム配列解読後の各遺伝子の機能解析を目的とした研究において最も重要なツールとしても注目されている。

一方欠点としては、血球系の細胞などアデノウイルス受容体である CAR の発現が乏しい細胞への遺伝子導入効率が低いこと、高濃度のベクターを作用させると細胞毒性を示すことがあること、免疫反応を引き起こすことなどが挙げられる (これらの欠点を克服するための方法については後述する)。

3. アデノウイルスベクターの作製法

従来、アデノウイルスベクターは 293 細胞内での相同組換えを利用して作製されていた^{5), 7)}。すなわち、目的遺伝子の発現単位を E1 領域の上流と下流のゲノム DNA の一部の間に組み込んだプラスミド (あるいはコスミド) と、E1 領域を除く

ウイルスゲノム全長 (あるいは E1 領域を除くウイルスゲノム全長を有するプラスミド) を 293 細胞にコ・トランスフェクションし、E1 領域前後の相同な遺伝子配列領域間での相同組換えを期待し、E1 領域を外来遺伝子に置き換えるというものである。しかしながら、動物細胞内での相同組換えの効率がよくないことや、煩雑な作業を必要とすること、293 細胞の染色体に組み込まれている E1 遺伝子とも相同組換えを起こし、高頻度に野生型のウイルスからなるクローンも生成するという問題点があり、ベクターの作製はそれほど容易なものではなかった。これはアデノウイルスのゲノムサイズが約 36 kb と巨大なため単一の制限酵素切断部位を得ることが困難であり、プラスミド構築に基づいて簡単に E1 領域を外来遺伝子に置き換えるような方法が開発されていなかったことによる起因している。

著者らは、これまであまり用いられることがなかった I-CeuI と P1-SceI (これらの酵素はアデノウイルスゲノムを切断しない) という少なくともそれぞれ 9-10, 11 bp を認識する制限酵素に着目し、これらの酵素の認識配列を E1 欠損領域に組み込むことによって、簡便な 1 ステップの *in vitro* ライゲーションに基づいたプラスミド構築で外来遺伝子を E1 欠損領域に挿入する方法を開発した^{9), 10)} (図 3)。作製した組換えプラスミドをゲノム調剤に存在する制限酵素 PacI で処理することにより線状にし、293 細胞にトランスフェクションすると、組換えアデノウイルスが生じる。本法は、1) 簡便なプラスミド構築に基づいているため、特異的な試薬・テクニックを必要とせず、だれでも簡単にウイルス DNA に相当するプラスミドの作製が可能であり、2) 相同組換えを必要としないため効率がよい、3) 均一なウイルス DNA (に相当するプラスミド) を 293 細胞へ導入することによりウイルスを作製するので、野生型ウイルスからなるクローンを生成する可能性は極めて低く (4.1 項で述べるように、ベクター増殖中に野生型ウイルス

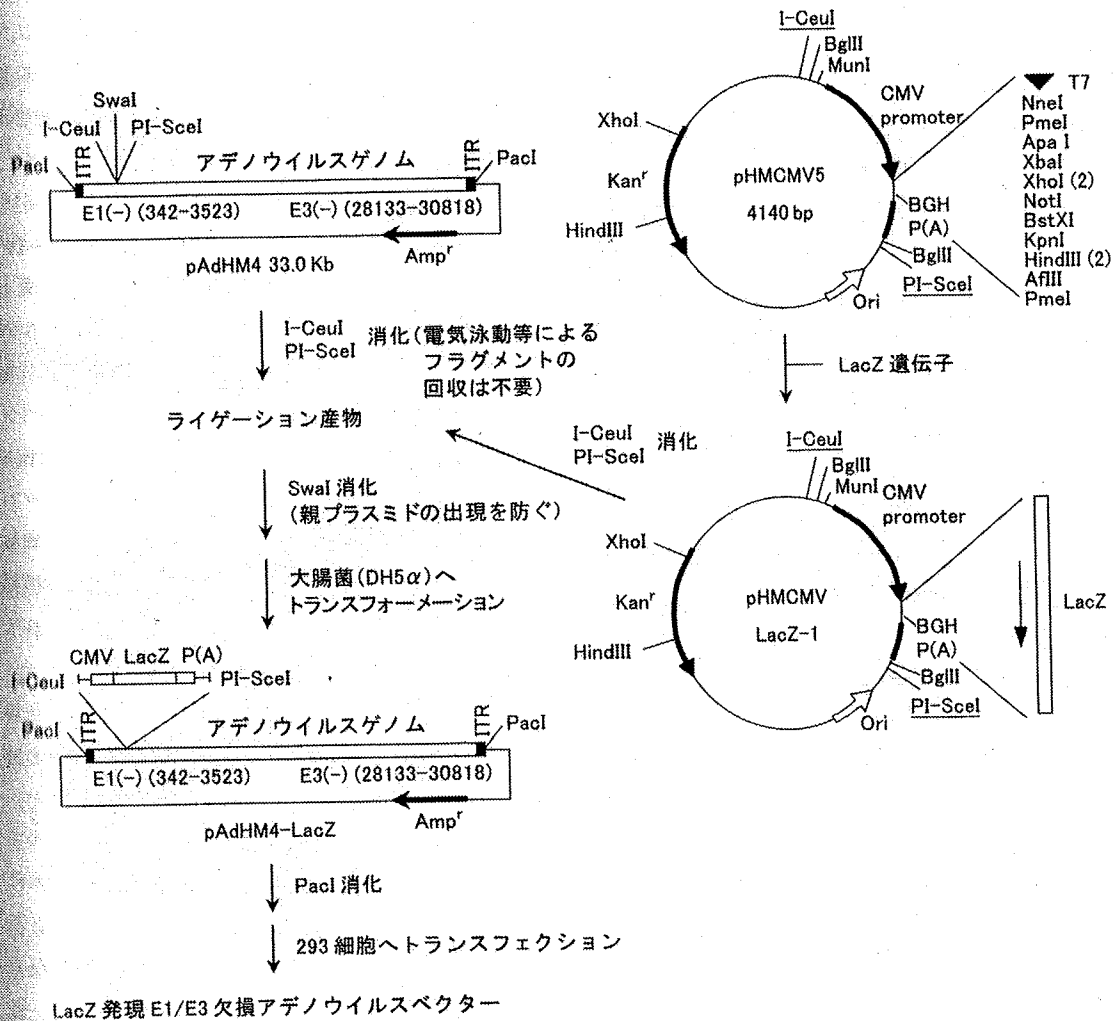


図3 βガラクトシダーゼ(LacZ)発現E1/E3欠損アデノウイルスベクターの作製例

I-CeuIとPstI配列を有したシャトルプラスミドpHMCMV5(カナマイシン耐性遺伝子を持っている)にLacZの遺伝子を組み込んだプラスミドと、E1欠損領域にユニークな制限酵素部位のI-CeuI, SwaI, PstI認識配列を持ちE1/E3領域を除去したアデノウイルス全ゲノムを有したベクタープラスミドpAdHM4を、I-CeuIとPstIで切断し、両者を直接ライゲーションする。ライゲーション産物をSwaI消化(組換えプラスミドはSwaI部位を消失しているが親プラスミドはSwaI部位を持っているため、SwaI消化することで親プラスミドは大腸菌に導入しても生育しない)し、大腸菌にトランスフォーメーション、アンピシリンプレートに播種すると、LacZ発現単位をE1欠損領域に有した目的の組換えプラスミドのみが選択できる。生じたプラスミドをゲノム両端に存在する制限酵素PstI部位で切断することにより線状にし、293細胞にトランスフェクションすると、組換えアデノウイルスベクターができる。なお、本システムでは、第1世代のベクターであるE1(あるいはE1/E3)欠損型のベクター作製可能なベクタープラスミドpAdHM3, -4, -10, 第2世代のE1/E3/E4欠損型のベクター作製可能なpAdHM12(E4発現293細胞が必要)、プロモーターカセットを有していないシャトルプラスミド、CMVあるいはRSVのプロモーターカセットを既に有しているシャトルプラスミドなど様々なベクターシステムが用意されており、研究目的に合わせて使い分けることができるようになっている。

スが生成する可能性はある), プラーク精製などを通した組換えウイルスのスクリーニング, 精製を必ずしも必要としない, といった長所を有しており, アデノウイルスベクターの作製は格段に簡略化された。すでに, 本システムは市販化されており, アデノウイルスベクター作製法の主流となりつつある(本系はスタンフォード大学 Dr. Mark A. Kay のもとで開発されたものである)。

4. アデノウイルスベクターの品質・安全性上の課題と次世代ベクターの開発

アデノウイルスベクターの品質・安全性上の課題に関しては, ウイルスベクターに共通の事項(第2部 第1章 概論参照)に加え, 特に本ベクターにおける懸念事項となっている増殖性ウイルス(replication competent adenovirus; RCA)に関する問題, およびベクター投与により生ずる免疫反応の問題に関して, 現状と対策法について解説する。

4.1 増殖性ウイルス(RCA)

アデノウイルスベクターは増殖に必須のE1領域を欠損しているため, 通常の細胞中では増殖できないが, ベクター製造過程にパッケージング細胞である293細胞の染色体に組み込まれているE1遺伝子とベクターのゲノムが相同組換えを起こすために, 現在の技術ではある確率でRCAが出現することは避けられない。すなわち, 293細胞にはアデノウイルス5型の1-4344 bpのDNAが組み込まれていると考えられており¹⁰⁾, E1領域を欠損したアデノウイルスベクター(342-3523 bpを欠損しているものが多い)とは, E1領域の前後で相同な遺伝子配列(1-341 bpおよび3524-4344 bp)を持つため, RCAが出現する(図4A)。したがって, 野生型ウイルスの出現のためには複数回の相同組換えを必要とするレトロウイルスベク

ターや, 相同組換えによる野生型ウイルスの出現は起こり得ないアデノ随伴ウイルスベクターに比べ, アデノウイルスベクターにおける野生型ウイルスの混入確率は高いといえる。

現在の米国FDA(Food and Drug Administration)が推奨しているRCA混入に関する許容値は, 3×10^4 particle titer あたり RCA1 infectious tite 未満となっている。なお, ATCC(American Type Culture Collection)より Adenovirus Reference Material(標準品)が入手可能であり, アデノウイルスベクターの粒子数(物理化学的タイター: particle titer)および感染力価(生物学的タイター: infectious titer)のスタンダードとして, また実験(施設)間での相互比較の参照基準として, 本標準品を用いてタイター測定を行うことが推奨されている。

RCAを含んだベクターが患者に投与された場合の危険性に関しては, 成人の60-70%以上はアデノウイルスに対する抗体を持っていること, 本来病原性は低く軽い風邪を引き起こすウイルスであること, ワクチンとしてアデノウイルスが投与された際に大きな副作用はみられなかったことなどから, 正常な骨髄機能・肝機能・腎機能が保ち, 重篤な併発疾患がない患者であれば, 重度の問題を引き起こす可能性は低いと考えられたが, 推奨値以下のRCAの混入しかみられないベクターストックを用いて, 適切な患者の選択およびベクター投与後の患者の健康状態の厳重な検査を通して臨床試験を進めていけば, RCAの問題は容認されるものと考えられる。

RCAの検出に用いる試験方法としては, E1領域を欠損したアデノウイルスベクターを増幅しない通常の細胞(ヒト肺癌細胞株A549など)にベクターストックを感染させ, CPE(cytopathic effect)細胞中でウイルスが増殖する結果, 細胞が死滅する現象)の出現を観察するのが通常である。すなわち, RCAが混入していれば, 通常の細胞においてもCPEが起こることになる。定量的PCR