

図4 増殖性アデノウイルス(RCA)の出現と改良型システム

- (A) 従来型のパッケージング細胞である293細胞は、E1遺伝子を含むアデノウイルスの1-4344 bpのゲノムを有しており、E1欠損型アデノウイルスベクターは通常342-3523 bpの遺伝子を欠損している。すなわち、アデノウイルスベクターにおける外来遺伝子発現単位を含む前後の配列(1-341 bp; 3524-4344 bp)は293細胞中のE1遺伝子と相同な配列を含むため、それらの領域で相同組換えを起こしRCAが出現する。
- (B) 改良型のパッケージング細胞であるPER細胞(human embryonic retinoblast由来)はアデノウイルスの459-3510 bpのゲノムを有しており、対応するE1欠損型アデノウイルスベクターは459-3510 bpの遺伝子を欠損している。この細胞とベクターとの組み合わせでは相同な遺伝子配列は含まないためRCAは理論上出現しない。
- (C) E1A遺伝子とE1B遺伝子を、異なる遺伝子発現単位として異なる染色体部位に組み込んだパッケージング細胞は、E1欠損型アデノウイルスベクターのE1欠損領域の両端部位との相同配列を同時にもたないためRCAは出現しない。

アデノウイルスゲノムを太線で、細胞由来ゲノムDNAを点線で、相同な遺伝子配列領域を斜線で示した。pIXはE1Bの下流に存在するヘキソンに付随したタンパク質(pIX)をコードした遺伝子であることを示す。数字で示したのはアデノウイルスのゲノム番号を示す。ITR(inverted terminal repeat)はゲノム両端に存在する逆向き反復配列でウイルスゲノムの複製開始に必要であり、複製の起点となる。

用いたRCAの高感度検出法も開発されている¹¹⁾。一方、ベクターゲノムとパッケージング細胞に組み込まれているE1遺伝子との相同な遺伝子配列を完全になくすことにより、RCAが理論上起こり得ないシステムも開発されている^{12, 13)}(図1B)。すなわち、Fallauxらの開発したシステムでは¹⁰⁾、アデノウイルスゲノムのE1遺伝子の459-3510 bpの配列を組み込んだパッケージング細胞

(PER細胞)と、ウイルスゲノムの459-3510 bpの遺伝子配列を欠損したベクターからなっており、理論上相同組換えは起こり得ない(非相同組換えにより低頻度ながらRCAが出現することが報告されている¹³⁾)。最近では、E1A発現カセットとE1B発現カセットを別々のベクターに搭載させて作成したパッケージング細胞が報告されており(すなわち、E1A遺伝子とE1B遺伝子が異なる

染色体部位に挿入されている), この細胞を用いた場合は, PBR 細胞を用いた場合に RCA が検出された条件においても, RCA の出現は全く起こらないことが示されている(図 4C)¹⁵⁾。

また, 後述する第 2 世代, 第 3 世代のアデノウイルスベクター(これまで述べてきた E1 欠損型ベクターは第 1 世代ベクターと呼ばれている)では, 一部あるいは全てのウイルス遺伝子を欠損していることから, RCA の出現頻度は極めて低いと考えられる。今後の遺伝子治療臨床試験では, これらのパッケージング細胞, ベクターシステムが用いられることが予想される。

4.2 アデノウイルスベクター投与に伴う免疫反応と次世代ベクターの開発

アデノウイルスベクターを生体に投与した場合におこる免疫反応としては, 大別するとベクター投与直後に生ずる自然免疫, ウイルスタンパク質に対する液性免疫, さらにベクター感染細胞に対する細胞性免疫に分けられる。

ウイルスやバクテリア等から生体を守る第一防御システムとして, 生体は自然免疫系を活性化させるが, アデノウイルスベクターを投与した場合にも, インターロイキン-6(IL-6)や IL-12 をはじめとする炎症性サイトカインの産生が起こる¹⁴⁾。1999 年に米国ペンシルバニア大学で起きたアデノウイルスベクター投与に伴う死亡事故は, 自然免疫系の過剰な活性化が原因と考えられており, ベクター投与後の自然免疫の活性化を抑制できるベクターや方法論の開発が重要な研究課題となっている。現在のところ, アデノウイルスベクター投与後の自然免疫活性化のメカニズム(細胞側因子やウイルス側因子など)は全く不明であり, これらの解明は安全な遺伝子治療の実現に向けて大きな課題である。なお, 後述するトリプル改変アデノウイルスベクターは, メカニズムは不明であるが, 自然免疫の活性化が起こりにくいことが判

明している。

液性免疫に関しては, ベクター投与後生ずるペントンやヘキソンに対する抗体が, 2 回目以降のベクターの効果を阻害することが問題となっている。この問題に関しては, 抗原的に異なった血清型のベクターを作製することや(後述), 主要な抗原部位であるヘキソンの一部を改変することで克服しようとするアプローチなどが報告されている^{15), 16)}。

一方, 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する細胞性免疫の問題解決に向けては, 様々な研究が活発に行われている。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 領域タンパク質の働きや, 非特異的な転写などによりウイルスタンパク質の産生が少量ながら起こり, こ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, 結果的に感染したアデノウイルスベクター上の目的遺伝子の発現が一過性にとどまる原因となっていることが明らかとなった¹⁷⁾⁻¹⁹⁾。そこで, 細胞性免疫反応を伴うことのない抗原性の低いベクターを開発する目的で, E1(あるいは E1/III)領域に加え, E2A や E4 領域も欠損させてウイルスタンパク質の産生を起こりにくくした第 2 世代のベクター²⁰⁾(図 1C, D), さらに, 全てのウイルス遺伝子を欠損させた第 3 世代のベクター(gutted ベクターあるいは後述のように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 helper-dependent ベクターと呼ばれることが多い)が開発されている²¹⁾(図 5)。ここでは将来的には主流となることが期待されている gutted ベクターについて簡単に解説する。

また, 標的細胞への感染能・親和性を高めたベクターは, より低投与量で効率のよい外来遺伝子の発現が期待でき, かつ標的細胞以外の組織・臓

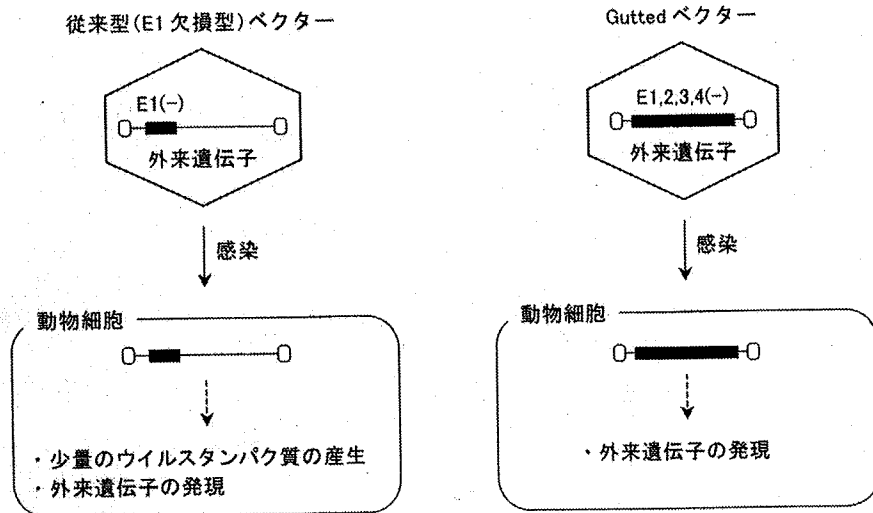


図5 第1世代(E1欠損型)ベクターと第3世代(gutted)ベクターの比較

E1欠損型ベクターを動物細胞に感染させると、外来遺伝子の発現だけでなく、少量ではあるがウイルスタンパク質も産生される。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ベクターにおいては、ウイルス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起こる。

腫へのベクターの移行性は抑えられることから、免疫反応の副作用を抑制できると考えられる。このような機能を備えたベクターとして、ベクター表面タンパク質(カプシドタンパク質)を改変させることにより、標的細胞親和性を制御することが可能なカプシド改変アデノウイルスベクター^{22)~30)}や他の血清型由来のアデノウイルスベクター^{31), 32)}について紹介する。

なお、免疫抑制剤などの薬剤を用いることによって、自然免疫や液性免疫、細胞性免疫を抑制することも可能であるが、ここでは省略させていただきます。

(1) Gutted アデノウイルスベクター

アデノウイルスベクターによる免疫反応を最小限に抑えるため、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0.4 kb、右端約0.2 kb)以外の全てのウイルス遺伝子を欠損させたguttedベクターが開発されている(図5)。このベ

クターは同時に、最大約36 kbまでの外来遺伝子を挿入できるという長所も合わせ持つことになる。

guttedベクターの作製法としては種々のものが報告されているが、現在最も広く用いられているのは、すべてのウイルスタンパク質の供給をヘルパーウイルス(通常E1欠損型ベクター)に依存して外来遺伝子だけを搭載したguttedベクターを増殖させ、目的のベクターウイルスとヘルパーウイルスを塩化セシウムの密度勾配遠心で物理化学的に分離するというものである²¹⁾。

guttedベクターを用いた動物実験では、肝臓、筋肉、脳、肺など種々の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²¹⁾。アデノウイルスベクターにより細胞に導入された遺伝子は、染色体に組み込まれずエピソームとして核内に存在するが、細胞分裂しない分化した組織をターゲットとした場合に

は、マウスの一生(約2.5年)にわたって目的遺伝子の発現と治療効果が認められる場合があることも報告されている³³⁾。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5-6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、これらの問題点が解決されれば、gutted 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用ベクターの主流になると考えられる。

(2) カプシド改変アデノウイルスベクター

アデノウイルスベクターは多くの組織・細胞への遺伝子導入が可能であるが、ベクターの感染域に組織特異性がなく、全身投与した場合多くの組織・細胞に非特異的に移行すること、逆に、アデノウイルス受容体(CAR)の発現がない細胞(気道上皮細胞、平滑筋細胞、T細胞、マクロファージ、造血幹細胞、樹状細胞、間葉系幹細胞、一部の癌細胞など)には効率よく遺伝子導入できないことが明らかとなっている。そのため、標的組織局所にベクターを投与しても、組織から漏れ出たベクターが他臓器に移行して免疫反応を助長したり、CARの発現がない(あるいは弱い)組織をターゲットとした場合には、高濃度のベクターを投与する必要があるため、細胞・組織障害、免疫反応という副作用をもたらすことになる。感染域を制御できるベクターの開発は、このような問題点を克服でき、最終的にはベクターの静脈内投与によっても選択的な標的細胞移行性を示すターゲティングベクターの開発につながるため、重要な研究課題となっている。

アデノウイルスの感染は、ファイバーが細胞表面上のCARに結合するのが第1ステップであるため¹⁾、ファイバーを修飾することにより、ベクターの感染域を変えることが可能になる²²⁾⁻³⁰⁾。著者らは、ファイバー分子への外来ペプチドの挿

入に最適な部位(HIループやC末端)をコードしたゲノムDNA上に、ユニークな制限酵素部位を挿入し、1ステップの *in vitro* ライゲーションで挿入したい任意のペプチド配列に相当する合成オリゴDNAをファイバー遺伝子領域に導入し、簡単にファイバー改変アデノウイルスベクターが作製できるシステムを開発している^{24), 26)}。例えば、インテグリン(α_v)やヘパラン硫酸との親和性を有するRGD配列やポリリジン配列(それぞれ)をファイバーに組み込んだベクターは、CARを発現していない細胞に対してもインテグリンやヘパラン硫酸経由で効率よく遺伝子導入できることが明らかとなっている(図6)。目的とする組織に特異的な(あるいは親和性のある)ペプチドをファイバーに組み込んだファイバー改変アデノウイルスベクターは、標的細胞特異性を高めたり、遺伝子導入効率を改善しベクター投与量を下げることが可能となり、最小限の副作用で最大の効果上げることが期待できる。例えば、マウスに移植したCAR陰性の固形癌にRGD配列を付与したアデノウイルスベクターを腫瘍内に投与した場合は、従来のアデノウイルスベクターを用いた場合に比べ腫瘍での遺伝子発現が約40倍に上昇し、逆に腫瘍から漏れ出たベクターが肝臓に移行しておこる肝臓での遺伝子発現が約1/8に減少しており²⁹⁾、有効性の上昇と副作用の軽減が期待できる。

ファイバー改変アデノウイルスベクターによる感染域の制御法としては、ファイバー部分を、CAR以外の分子を認識することが知られている sub-group B(例えば3, 11, 35型アデノウイルスなど)に属するアデノウイルス由来のファイバーに置換したベクターも開発されている²⁸⁾⁻³⁰⁾(図6)。11, 35型アデノウイルスのファイバーを有したベクターの場合、CD46を介した効率のよい遺伝子導入が可能になる(3型アデノウイルスの受容体は不明であるがCAR以外を認識する)。

一方、nativeのアデノウイルスの感染ルートを回避させることで、ターゲティング能を有した

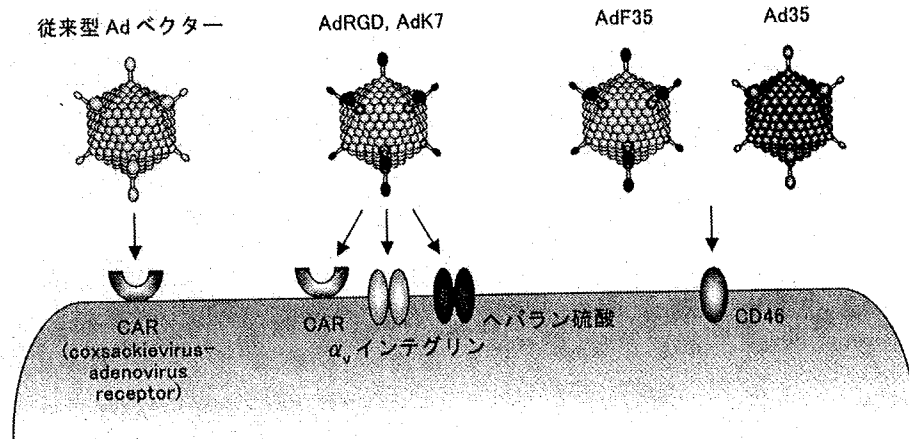


図6 改良型アデノウイルスベクターによる遺伝子導入

野生型のファイバーを持った従来型の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(K7:リジンが7つ続く)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。また、ファイバー部分をsub-group Bの35型アデノウイルスのファイバーに置換したベクター(AdF35)や、全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。3型あるいは11型アデノウイルス由来のファイバーを有したベクターも開発されている(3型アデノウイルスの受容体は不明であり、11型アデノウイルスの受容体はCD46である(他の分子も認識しうることが想定されている))。

ベクターの開発研究も進んでいる。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モチーフが α_v インテグリンと結合することによって起こる感染ルートや、ファイバーのシャフト部分のKKTK(Lys-Lys-Thr-Lys)からなるヘパリン結合ドメインがヘパラン硫酸と結合することによって起こる感染ルートが存在する。これらの感染経路を遮断して、ターゲット細胞特異的に結合するリガンドをカプシド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²⁷⁾(図7)。ファイバーノブのABループやFGループに変異を導入すればCARと結合できないベクターが作製でき、ペントンベースのRGDモチーフを欠損させれば α_v インテグリンと結合できないベクターが作製できる。また、ファイバーのシャフト部分の

KKTKモチーフに変異を加えたり、KKTKモチーフを含まない他の血清型のファイバーシャフト領域(例えば35型アデノウイルス由来のものなど)に置換することでヘパラン硫酸と結合できないベクターが作製できる。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、95%以上のベクターは肝臓へ移行し、遺伝子を発現するが、著者らはCAR、 α_v インテグリン、ヘパラン硫酸との3領域との結合を同時に欠損させたトリプル改変アデノウイルスベクターが、肝臓への遺伝子導入効率を1万倍以上減少させ、他の臓器での遺伝子発現もほとんど示さなくなることを明らかにし、積極的に特定の臓器に移行しないベクターの開発に成功している^{34), 35)}。本ベクターのファイバーノブのHIループやC末端コード領域には、任意の外来ペプチドコード遺伝子が容易に挿入できるように、制限酵素ユニーク部位が付与されており、リガンドを自在にベクター表面に表現できるよう

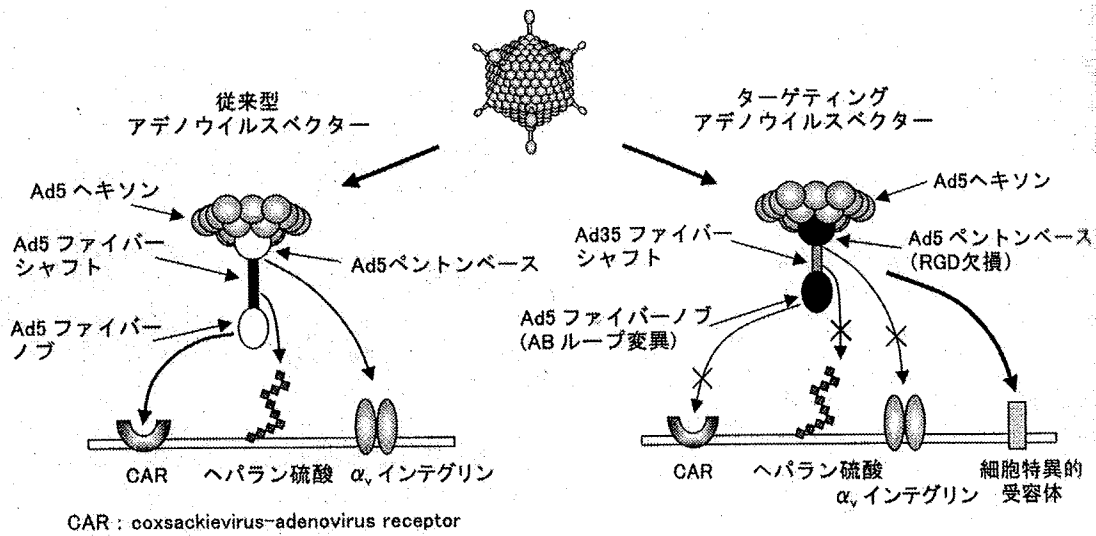


図7 ターゲティング能を有したアデノウイルスベクター

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、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、④細胞特異的受容体を介してのみ感染するベクターを開発する必要がある。細胞特異的受容体を認識するリガンドは、ファイバーやヘキサソン(アデノウイルスの主要カプシドタンパク質)、protein IX(ヘキサソンとヘキサソンの間に存在するタンパク質)などに付与できる。

になっている。本システムが、ターゲティング能を持ったアデノウイルスベクター開発のための基盤になると期待される。なお、本トリプル改変アデノウイルスベクターは、全身投与した直後におこるIL-6産生が、従来のアデノウイルスベクターの場合とは異なり、ほとんど生じず、自然免疫活性化能が低いことも判明している³⁵⁾(IL-12産生量は従来のベクターと同等レベルであり、サイトカイン・ケモカインの種類により産生抑制が認められるものがある)。

(3) 他の血清型由来のアデノウイルスベクター

従来のアデノウイルスベクターはsub-group Cに属するヒトアデノウイルス5型(あるいは2型)を基盤として作製されている。しかしながら、5型アデノウイルスに対する抗体を保持しているヒトの割合は高く(日本人の場合、強陽性のヒトの

割合は58%)³⁶⁾、既存抗体により遺伝子導入活性が減弱する可能性がある問題点や、遺伝子導入時のCAR依存性の問題点を克服できるベクターとして、抗体保持率が低く(日本人の場合、強陽性のヒトの割合は2%)³⁶⁾、CD46を認識して感染できるsub-group Bに属するアデノウイルスベクター(11型や35型)が著者らのグループなどから報告されている^{31), 32), 37)}(図7)。CD46はヒト細胞ではほとんどの組織・細胞で発現していること、特に癌細胞では発現上昇が認められることから、局所へベクターを投与するプロトコールにおいては有力なベクターになりうると考えられる。またsub-group Bに属するアデノウイルスベクターは、従来の5型ベクターとは異なり、造血幹細胞を普む細胞分画のCD34陽性細胞へも効率よく遺伝子導入できることから^{31), 32), 37)}、細胞増殖・分化制御を目的とした造血幹細胞遺伝子治療において

有効であろう。ヒト以外のアデノウイルスを利用したものでは、チンパンジー、イヌ、ヒツジ、トリ、ウシ、マウス由来アデノウイルスベクターが報告されている。

最終的には、これら様々な血清型のベクターやプロモーター改変ベクターを、目的組織特異的なプロモーターで外来遺伝子を発現させる転写レベルでの標的化技術や gutted ベクターと組み合わせることで、標的組織や疾病に応じて、高い安全性・有効性を示すベクターの開発が可能になるであろう。

おわりに

遺伝子治療臨床試験、動物実験などから問題点が指摘されてきたアデノウイルスベクターであるが、種々の次世代型ベクターや新規パッケージング細胞など高い安全性・有効性を確保したシステムが開発されている。今後、これらの改良型システムが遺伝子治療臨床試験で用いられ、遺伝子治療の成功に寄与することが期待される。

参考文献

- 1) Bergelson J. M., Cunningham J. A., Droguett G., Kurt-Jones E. A., Krithivas A., Hong J. S., Horwitz M. S., Crowell R. L. and Finberg R. W.: Isolation of a common receptor for Coxsackie B viruses and adenoviruses 2 and 5. *Science*, 275: 1320-1323, 1997.
- 2) Wickham T. J., Mathias P., Cheres D. A. and Nemerow G. R.: Integrins alpha v beta 3 and alpha v beta 5 promote adenovirus internalization but not virus attachment. *Cell*, 73: 309-319, 1993.
- 3) Greber U. F., Willetts M., Webster P. and Helenius A.: Stepwise dismantling of adenovirus 2 during entry into cells. *Cell*, 75: 477-486, 1993.
- 4) Leopold P. L., Ferris B., Grinberg I., Worgall S., Hackett N. R. and Crystal R. G.: Fluorescent virions: dynamic tracking of the pathway of adenoviral gene transfer vectors in living cells. *Hum. Gene Ther.*, 9: 367-378, 1998.
- 5) Bett A. J., Haddara W., Prevec L. and Graham F. L.: An efficient and flexible system for construction of adenovirus vectors with insertions or deletions in early regions 1 and 3. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 91: 8802-8806, 1994.
- 6) Mizuguchi H. and Kay M. A.: A simple method for constructing E1- and E1/E4-deleted recombinant adenoviral vectors. *Hum. Gene Ther.*, 10: 2013-2017, 1999.
- 7) Miyake S., Makimura M., Kanegae Y., Harada S., Sato Y., Takamori K., Tokuda C. and Saito I.: Efficient generation of recombinant adenoviruses using adenovirus DNA-terminal protein complex and a cosmid bearing the full-length virus genome. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 93: 1320-1324, 1996.
- 8) Mizuguchi H. and Kay M. A.: Efficient construction of a recombinant adenovirus vector by an improved in vitro ligation method. *Hum. Gene Ther.*, 9: 2577-2583, 1998.
- 9) Mizuguchi H., Hayakawa T., and Kay M. A.: Approaches for generating recombinant adenovirus vectors. *Adv. Drug. Del. Rev.*, 52: 165-176, 2001.
- 10) Louis N., Eveleigh C. and Graham F. L.: Cloning and sequencing of the cellular-viral junctions from the human adenovirus type 5 transformed 293 cell line. *Virology*, 233: 423-429, 1997.
- 11) Ishii-Watabe A., Uchida E., Iwata A., Nagata R., Satoh K., Fan K., Murata M., Mizuguchi H., Kawasaki N., Kawanishi T., Yamaguchi T., Hayakawa T.: Detection of replication-competent adenoviruses spiked into recombinant adenovirus vector products by infectivity PCR. *Mol. Ther.*, 8: 1009-1016, 2003.
- 12) Fallaux F. J., Bout A., van der Velde I., van den Wollenberg D. J., Hehir K. M., Keegan J., Auger C., Cramer S. J., van Ormondt H., van der Eb A. J., Valerio D. and Hoeben R. C.: New helper cells and matched early region 1-deleted adenovirus vectors prevent generation of replication-competent adenoviruses. *Hum. Gene Ther.*, 9: 1909-1917, 1998.
- 13) Farson D., Tao L., Ko D., Li Q., Brignetti D., Segawa K., Mittelstaedt D., Harding T., Yu D.C., Li

- Y. : Development of novel E1-complementary cells for adenoviral production free of replication-competent adenovirus. *Mol. Ther.*, 14 : 305-311, 2006.
- 14) Muruve D. A. : The innate immune response to adenovirus vectors. *Hum. Gene Ther.*, 15 : 1157-1166, 2004.
 - 15) Roy S., Shirley P. S., McClelland A. and Kaleko M. : Circumvention of immunity to the adenovirus major coat protein hexon. *J. Virol.*, 72 : 6875-6879, 1998.
 - 16) Roberts D. M., Nanda A., Havenga M. J., Abbink P., Lynch D. M., Ewald B. A., Liu J., Thorner A. R., Swanson P. E., Gorgone D. A., Lifton M. A., Lemckert A. A., Holterman L., Chen B., Dilraj A., Carville A., Mansfield K. G., Goudsmit J., Barouch D. H. : Hexon-chimaeric adenovirus serotype 5 vectors circumvent pre-existing anti-vector immunity. *Nature*, 441 : 239-243, 2006.
 - 17) Yang Y., Nunes F. A., Berencsi K., Furth E. E., Gonczol E. and Wilson J. M. : Cellular immunity to viral antigens limits E1-deleted adenoviruses for gene therapy. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 91 : 4407-4411, 1994.
 - 18) Yang Y., Ertl H. C. and Wilson J. M. : MHC class I-restricted cytotoxic T lymphocytes to viral antigens destroy hepatocytes in mice infected with E1-deleted recombinant adenoviruses. *Immunity*, 1 : 433-442, 1994.
 - 19) Yang Y., Xiang Z., Ertl H. C. and Wilson J. M. : Upregulation of class I major histocompatibility complex antigens by interferon gamma is necessary for T-cell-mediated elimination of recombinant adenovirus-infected hepatocytes *in vivo*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 92 : 7257-7261, 1995.
 - 20) Wang Q. and Finer M. H. : Second-generation adenovirus vectors. *Nat. Med.*, 2 : 714-716, 1996.
 - 21) Palmer D. J. and Ng P. : Helper-dependent adenoviral vectors for gene therapy. *Hum. Gene Ther.*, 16 : 1-16, 2005.
 - 22) Wickham T. J., Roelvink P. W., Brough D. E. and Kovacs I. : Adenovirus targeted to heparan-containing receptors increases its gene delivery efficiency to multiple cell types. *Nat. Biotech.*, 14 : 1570-1573, 1996.
 - 23) Dmitriev I., Krasnykh V., Miller C. R., Wang M., Kashentseva E., Mikheeva G., Belousova N. and Curiel D. T. : An adenovirus vector with genetically modified fibers demonstrates expanded tropism via utilization of a coxsackievirus and adenovirus receptor-independent cell entry mechanism. *J. Virol.*, 72 : 9706-9713, 1998.
 - 24) Mizuguchi H., Koizumi N., Hosono T., Utoguchi N., Watanabe Y., Kay M. A. and Hayakawa T. : A simplified system for constructing recombinant adenoviral vectors containing heterologous peptides in the HI loop of their fiber knob. *Gene Ther.*, 8 : 730-736, 2001.
 - 25) Mizuguchi H., and Hayakawa T. : Enhanced antitumor effect and reduced vector dissemination with fiber-modified adenovirus vectors expressing herpes simplex virus thymidine kinase. *Cancer Gene Ther.*, 9 : 236-242, 2002.
 - 26) Koizumi N., Mizuguchi H., Utoguchi N., Watanabe Y. and Hayakawa T. : Generation of fiber-modified adenovirus vector containing heterologous peptides in both the HI loop and C terminus of the fiber knob. 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.
 - 27) Mizuguchi H. and Hayakawa T. : Targeted adenovirus vectors. *Hum. Gene Ther.*, 15 : 1022-1033, 2004.
 - 28) Krasnykh V. N., Mikheeva G. V., Douglas J. T. and Curiel D. T. : Generation of recombinant adenovirus vectors with modified fibers for altering viral tropism. *J. Virol.*, 70 : 6839-6846, 1996.
 - 29) Shayakhmetov D. M., Papayannopoulou T., Stamatoyannopoulos G. and Lieber A. : Efficient gene transfer into human CD34(+) cells by a retargeted adenovirus vector. *J. Virol.*, 74 : 2567-2583, 2000.
 - 30) Mizuguchi H. and 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.
 - 31) Sakurai F., Mizuguchi H. and Hayakawa T. : Efficient gene transfer into human CD34+ cells by

- adenovirus type 35 vector. *Gene Ther.*, 10 : 1041-1048, 2003.
- 34) Sakurai F., Kawabata K., Yamaguchi T., Hayakawa T. and 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.
- 35) Kim I. H., Jozkowicz A., Piedra P. A., Oka K. and Chan L. : Lifetime correction of genetic deficiency in mice with a single injection of helper-dependent adenoviral vector. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 98 : 13282-13287, 2001.
- 36) Koizumi N., Mizuguchi H., Sakurai F., Yamaguchi T., Watanabe Y. and Hayakawa T. : Reduction of natural adenovirus tropism to mouse liver by fiber-shaft exchange in combination with both CAR- and alphav integrin-binding ablation. *J. Virol.*, 77 : 13062-13072, 2003.
- 37) Koizumi N., Kawabata K., Sakurai F., Watanebe Y., Hayakawa T. and Mizuguchi H. : Modified adenoviral vectors ablated for coxsackievirus-adenovirus receptor, alphav integrin, and heparan sulfate binding reduce *in vivo* tissue transduction and toxicity. *Hum. Gene Ther.*, 17 : 264-279, 2006.
- 38) Seshidhar R. P., Ganesh S., Limbach M. P., Brann T., Pinkstaff A., Kaloss M., Kaleko M. and Connelly S. : Development of adenovirus serotype 35 as a gene transfer vector. *Virology*, 311 : 384-393, 2003.
- 39) Stone D., Ni S., Li Z. Y., Gaggar A., DiPaolo N., Feng Q., Sandig V. and Lieber A. : Development and assessment of human adenovirus type 11 as a gene transfer vector. *J. Virol.*, 79 : 5090-5104, 2005.

(水口裕之/早川堯夫)

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

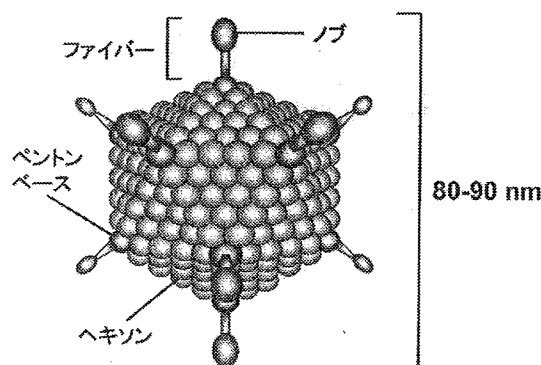


図1 アデノウイルスの構造

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 (獨医薬基盤研究所 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 ($\alpha_v\beta_3$, $\alpha_v\beta_5$) 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

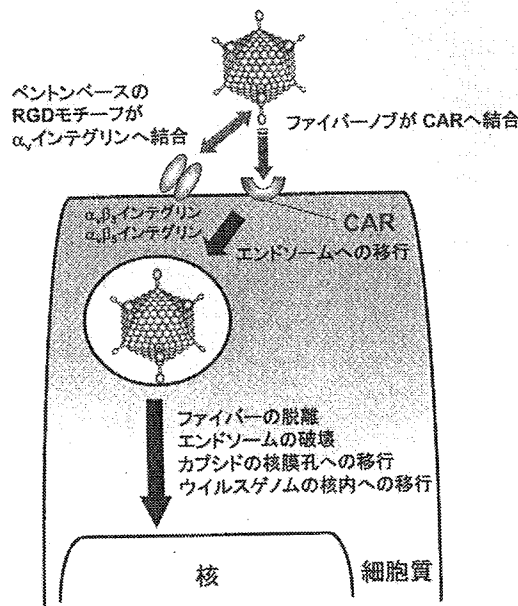


図2 アデノウイルスの細胞への感染様式

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 ($\alpha_v\beta_3$, $\alpha_v\beta_5$ 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ポソーム・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。

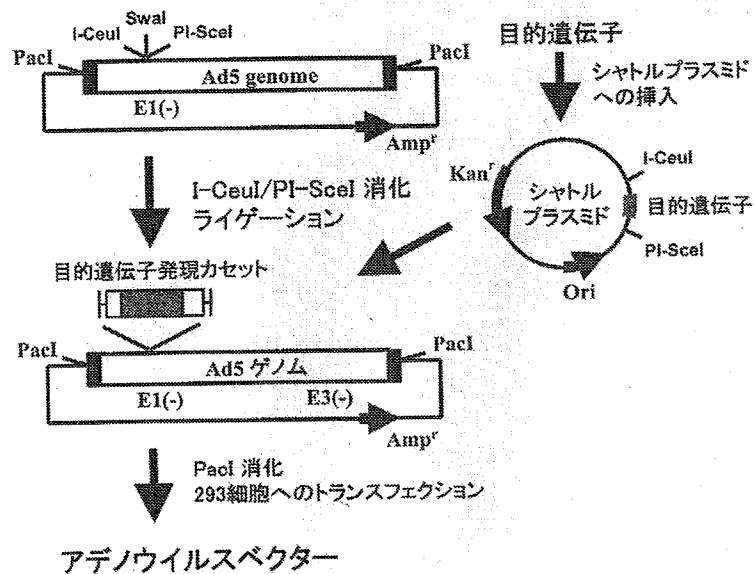


図3 *in vitro*ライゲーションに基づいた簡便なアデノウイルスベクターの作製

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、一生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、ウイルスメ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）⁹⁾（図4）。Guttedアデノウイルスベクターを用いた動物実験では、

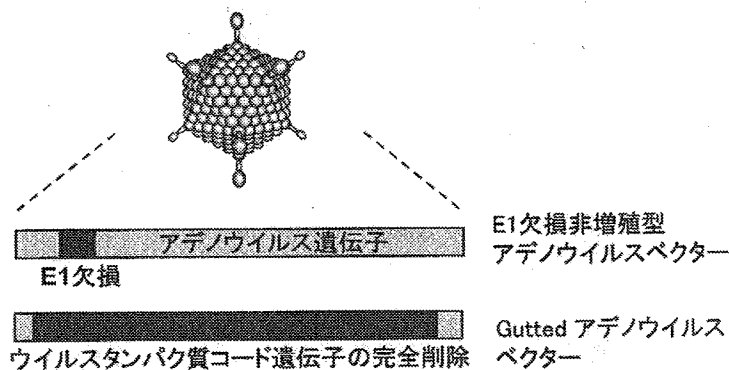


図4 Guttedアデノウイルスベクター

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³⁾。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用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 _vインテグリンに親和性がある

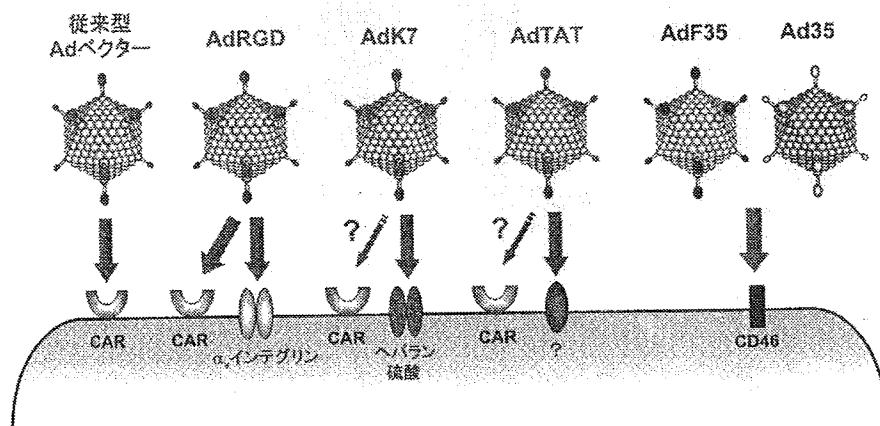


図5 カプシド改変アデノウイルスベクター

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 _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、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、ヘパラ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ラ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

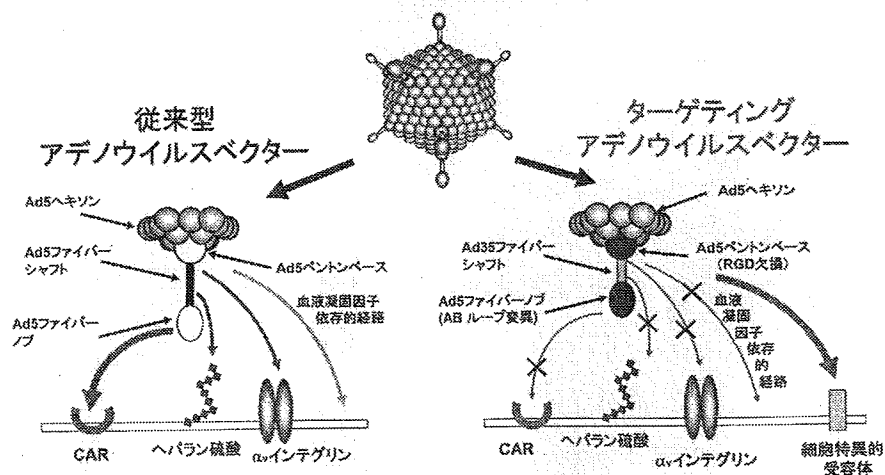


図6 ターゲティング能を有したアデノウイルスベクター

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、①ファイバーノブとCARとの結合を介した感染ルート、②低親和性であるがペントンベースのRGDモチーフが $\alpha_5\beta_1$ 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、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、④さらには血液凝固因子依存的な感染ルートを回避し、⑤細胞特異的受容体を介してのみ感染するベクターを開発する必要がある。細胞特異的受容体を認識するターゲティング分子は、ファイバーやヘキサソン（アデノウイルスの主要カプシドタンパク質）、protein IX（ヘキサソンとヘキサソンの間に存在するタンパク質）等に付与できる。

ノウイルスベクターの開発が可能になると考えられる。

アデノウイルスベクターの感染域や体内動態を改変するアプローチとしては、ポリエチレングリコール等の高分子でベクター表面を化学的に修飾する方法も活発に研究がなされている¹⁹⁾。また著者らは最近、micro RNAによる遺伝子発現制御機構をアデノウイルスベクターに付与することで、組織特異的に遺伝子発現を制御できるベクター系も開発済みである²⁰⁾。

12.7 おわりに

遺伝子を動物細胞に導入するためのキャリアとしては、自然界で巧妙な仕組みで自身の遺伝子を細胞に導入しているウイルスを利用することが効率面を考えると最適である。しかしながら、ウイルスをキャリアとする場合には、そのウイルス自身が持つ特性のために、適用範囲が限られたり、副作用の原因となることがある。本稿で述べたように、分子生物学、分子ウイルス学の技術を駆使することで、これらの課題点も克服可能になりつつあり、さらには新たな機能を付与して有効性を高めることも可能になっている。このようにして開発された新しいウイルスキャリア（ベクター）は、遺伝子治療への応用だけでなく、今や遺伝子機能解析等を目的とした基礎研究のためのツールとしても必須の基盤技術となっており、改良型ウイルスベクターが生命科学研究

の一層の発展のために貢献することが期待される。

文 献

- 1) H. Sakurai *et al.*, *J. Cont. Rel.*, **117**, 430-437 (2007)
- 2) H. Mizuguchi *et al.*, *Adv. Drug. Deli. Rev.*, **52**, 165-176 (2001)
- 3) H. Mizuguchi *et al.*, *Hum. Gene Ther.*, **9**, 2577-2583 (1998)
- 4) H. Mizuguchi *et al.*, *Hum. Gene Ther.*, **10**, 2013-2017 (1999)
- 5) D.J. Palmer *et al.*, *Hum. Gene Ther.*, **16**, 1-16 (2005)
- 6) D. Palmer *et al.*, *Mol. Ther.*, **8**, 846-52 (2003)
- 7) H. Mizuguchi *et al.*, *Gene Ther.*, **8**, 730-735 (2001)
- 8) N. Koizumi *et al.*, *J. Gene Med.*, **5**, 267-276 (2001)
- 9) S. Kurachi *et al.*, *Gene Ther.*, **14**, 1160-1165 (2007)
- 10) F. Sakurai *et al.*, *Gene Ther.*, **10**, 1041-1048 (2003)
- 11) F. Sakurai *et al.*, *Curr. Gene Ther.*, **7**, 229-238 (2007)
- 12) K. Kawabata *et al.*, *Mol. Pharmaceu.*, **3**, 95-103 (2006)
- 13) H. Mizuguchi *et al.*, *Hum. Gene Ther.*, **15**, 1022-1033 (2004)
- 14) D.M. Shayakhmetov *et al.*, *J. Virol.*, **79**, 7478-91 (2005)
- 15) S.N. Waddington *et al.*, *Cell.*, **132**, 397-409 (2008)
- 16) N. Koizumi *et al.*, *J. Virol.*, **77**, 13062-13072 (2003)
- 17) N. Koizumi *et al.*, *Hum. Gene Ther.*, **17**, 264-279 (2006)
- 18) S. Kurachi *et al.*, *Gene Ther.*, **14**, 266-274 (2007)
- 19) Y. Eto *et al.*, *J. Gene Med.*, **7**, 604-612 (2005)
- 20) T. Suzuki *et al.*, *Mol. Ther.*, in press

人工リンパ組織構築とは何か。

末松佐知子

独立行政法人医薬基盤研究所 基盤研究部 免疫細胞制御プロジェクト

What does artificial lymphoid organ mean?

Sachiko Suematsu

Laboratory of Immune Cell Regulation, National Institute of Biomedical Innovation

The adaptive immune system consists of multiple aspects of immune reaction arising from specific recognition of antigens. In vertebrates, secondary lymphoid organs are provided to accomplish the series of specialized reactions needed for defense against pathogens. The highly organized microarchitecture of the secondary lymphoid organs enables antigen, antigen-presenting cells and rare antigen-specific lymphocytes to interact, resulting in efficient immune response induction. It is now well known that stromal cells play an important role in the formation of the normal organized secondary lymphoid tissue microarchitecture.

We developed a method for construction of "artificial (secondary) lymphoid organ" introducing a stromal cell line-embedded in collagen sponge along with activated dendritic cells under renal sub-capsular space in mice. The artificial lymphoid organ had a basic but immunologically essential and characteristic feature of normal secondary lymphoid organ microarchitecture. Further, antigen-specific antibody formation could be induced quite effectively in the artificial organ in naive mice and even in severe immunodeficiency (SCID) mice. Our artificial lymphoid organ construction system is useful not only for understanding molecules and cell-cell interaction for the secondary lymphoid organ development and efficient adaptive immune response induction, also may imply a possible application for treatment of immune deficiency or cancer.

【キーワード】

ストローマ細胞, 生体適合性高分子材料,
二次リンパ組織, 適応免疫反応, 組織工学
stromal cell, biocompatible material,
secondary lymphoid organ,
adaptive immunity, tissue engineering

はじめに

二次リンパ組織は体外から侵入してきた病原微生物(抗原)を局所で補足し, 適応免疫が始動する場として高度に組織化された高次構造を備えている。1990年代後半以降の国内外の研究によりその特殊な組織構造が適応免疫反応の誘導に重要で

別刷請求先: 末松佐知子 〒567-0085 大阪府茨木市彩都あさぎ7-6-8
独立行政法人医薬基盤研究所 基盤的研究部 免疫細胞制御プロジェクト
TEL: 072-641-9811 (代表) FAX: 072-641-9812 Email: sachiko@nibio.go.jp

あることが再認識されることになった。

筆者らは近年進歩の著しい生体適合性高分子材料と組織工学技術を利用して二次リンパ組織の構造と機能を模倣した「人工リンパ組織」構築の研究を続けており、あるストローマ細胞を生体適合性高分子材料に組み込んでマウスの腎皮膜下に移植することにより免疫組織としての二次リンパ組織の基本構造を備え、機能的にも抗原特異的免疫反応を誘導し得る人工リンパ組織構築法を確立した。本研究を始めたきっかけはこれまでとは異なる新しい方法を使って二次リンパ組織の発生と適応免疫誘導のメカニズムを解明したいと考えたことによる。また、機能的な人工免疫組織が構築できれば将来様々な応用が可能となるはずである。本稿ではこれまでの二次リンパ組織に関する研究の流れとともに筆者らの人工リンパ組織を用いた研究の可能性について述べてみたい。

1. 二次リンパ組織の特殊な組織構造

「二次リンパ組織」とは脾臓、リンパ節、及び粘膜関連リンパ組織（扁桃、アデノイド、虫垂、パイエル板、気管支関連リンパ組織など）を指す。二次リンパ組織はリンパ球が抗原と効率よく出会うための場でありその目的に適した特殊な高次構造を備えているが、最も特徴的なのはT細胞とB細胞が明確に領域に分かれて存在する事である。B細胞領域（あるいは濾胞: follicle）の中心部には濾胞樹状細胞 (follicular dendritic cell: FDC) と呼ばれる特殊な細胞が突起を延ばしてネットワーク状構造を形成し成熟B細胞と密に接触しており、抗原特異的なB細胞の選択に関わっているのではないかと考えられているが実はその起源や機能など詳しいことは分かっていない。その他、二次リンパ組織には樹状細胞、マクロファージやストローマ細胞（間質細胞あるいは支持細胞）が存在している。ストローマ細胞の重要性については後述する。

二次リンパ組織は組織によって特徴的な脈管系が発達しており、例えばリンパ節では動脈、静脈とリンパ管の他に背丈の高い内皮細胞からなる特

殊な血管構造があり高内皮細静脈 (high endothelial venule: HEV) と呼ばれている¹⁾。HEVはパイエル板、扁桃などにも存在しており、ナイーブなリンパ球（抗原に出会っていない未感作のリンパ球）はこの HEV を介してリンパ組織に流入する事がわかっている。

2. 二次リンパ組織の発生に関与する因子

1) 遺伝子欠損マウスにおける二次リンパ組織の異常

二次リンパ組織の発生に異常がある遺伝子欠損マウスが多数報告されており、これらのマウスを解析する事により二次リンパ組織の特殊な構造自体が適応免疫機能に重要であることも明らかとなった²⁻⁶⁾。ここではtumor necrosis factor (TNF) ファミリー関連分子とリンパ組織性ケモカイン関連分子欠損マウスを中心に述べる (表1)。

TNFファミリー関連分子ノックアウトマウスの中で二次リンパ組織の異常が最初に報告されたのは、lymphotoxin α (LT α) ノックアウトマウスである¹⁾。LT α ノックアウトマウスにはパイエル板が存在せず、全身のほとんどのリンパ節は欠損し脾臓の組織構造も大きく乱れていた。さらにLT β 受容体 (LT β R) ノックアウトマウスではリンパ節欠損と脾臓組織構造の異常の程度が増強し、全身のリンパ節が完全に欠損する。LT β RはLT α 1 β 2ヘテロ3量体 (膜型 LT) の特異的なレセプターである。ちなみにLT α 、LT β は活性化リンパ球が発現しており、一方、LT β Rはリンパ球系細胞表面には存在せず、むしろ種々のリンパ組織のストローマ細胞に発現がみられる²⁾。Alymphoplasia (aly) 突然変異マウスでは、全身のリンパ節とパイエル板が欠損し脾臓の構造にも異常がみられるが、その原因はLT β R下流のシグナル伝達分子nuclear factor- κ B (NF- κ B) inducing kinase (NIK) の点変異によるということが分かっている³⁾。これらのマウスの解析結果からLT β Rを介したシグナルが二次リンパ組織の発生に必須であることがわかる。

ケモカインは炎症性ケモカイン inflammatory