

Table 1

Knockout mice showing abnormal secondary lymphoid organ development (for TNF family- and chemokine-related molecules)

| knockout mice | | LN | PP | spleen T/B area | spleen marginal zone | primary follicle | FDC network |
|------------------------------|-------------------------|------|-----|-----------------|----------------------|------------------|-------------|
| TNF family-related molecules | TNF <i>-/-</i> | + | ↓ | ○ | enlarged | (-) | (-) |
| | TNFR-I <i>-/-</i> | + | ↓ | ○ | ND | (-) | (-) |
| | TNFR-II <i>-/-</i> | + | + | ○ | ND | + | + |
| | LT α <i>-/-</i> | (-)* | (-) | × | × | (-) | (-) |
| | LT β <i>-/-</i> | (-)* | (-) | × | × | (-) | (-) |
| | LT β R <i>-/-</i> | (-) | (-) | × | × | (-) | (-) |
| | <i>aly/aly</i> | (-) | (-) | × | × | (-) | (-) |
| | TRANCE <i>-/-</i> | (-)* | + | ○ | × | + | ND |
| TRANCER <i>-/-</i> | (-) | ↓ | ○ | ○ | + | + | |
| Chemokine-related molecules | CXCR5 <i>-/-</i> | ↓ | ↓ | ○ | enlarged | × | (-) |
| | CXCL13 <i>-/-</i> | ↓ | ↓ | × | × | (-) | (-) |
| | CCR7 <i>-/-</i> | + | + | × | ND | + | + |
| | <i>plt / plt</i> | + | + | × | + | + | ND |

LN: lymph node PP: Payer's patch

+ : exist ↓ : reduced ND: not determined (-) : absent

(-)* : most of lymph nodes were absent, if not all

○ : normal tissue microarchitecture × : disturbed tissue microarchitecture

chemokineと恒常性ケモカイン homeostatic chemokineの2つに大別される。恒常性ケモカインのうちのCCL19, CCL21および CXCL13はリンパ組織性ケモカインlymphoid chemokineとも呼ばれ、その名の通りリンパ組織に特異的に発現していてリンパ球や樹状細胞のリンパ組織への遊走に関与している^{9,10}。リンパ組織性ケモカインのノックアウトマウスでもリンパ節欠損など二次リンパ組織の構造異常がみられる(表1)。また、plt (paucity of lymph node T cell) 突然変異を持つplt /pltマウスではリンパ節における T細胞と樹状細胞数の著しい減少が観察されるが、この変異の原因はCCL19と CCL21 ケモカイン遺伝子の異常によることが明らかとなっている^{9,10}。

2) lymphoid neogenesis 「リンパ組織新生」

前述のいくつかの分子については遺伝子欠損マウスと表裏をなす実験系としてトランスジェニックマウスが作製されており、ほぼ共通した興味深い結果が得られている。ラットのインシュリンプロモーターを用いてLT α 遺伝子を脾臓ランゲルハンス島 β 細胞で強制発現させたトランスジェニックマウスではランゲルハンス島周囲の組織に二次リンパ組織に似た組織構造が新生する (lymphoid neogenesis)¹¹。二次リンパ組織の発生に関与する他のサイトカインやケモカインのトランスジェニックマウスでも同様のリンパ組織新生が観察されている^{12,10}。

その他、慢性関節リュウマチやシェーグレン症候群などの慢性炎症部位では胚中心形成を伴うリンパ球の集積や二次リンパ組織様の組織像が見られることが昔からよく知られており、しばしばHEVの形成を伴うことが示されている。最近ではこれらの(異所性)リンパ組織新生は "tertiary lymphoid tissue" 「三次リンパ組織」と呼ばれることも多い¹³。

3) 二次リンパ組織ストローマ細胞の重要性について

リンパ節が欠損するLT β Rノックアウトマウスの骨髄細胞を放射線照射した正常マウスに移植するとリンパ節が再構築されるのに対し、逆に正常

マウスの骨髄細胞を放射線照射したノックアウトマウスに移植した場合にはリンパ節が再構築されない。この事から二次リンパ組織の発生異常は骨髄細胞(血球系細胞)の異常によるものではなく、放射線照射に耐性の細胞、すなわちストローマ細胞に原因があることが示唆される¹⁴。さらにストローマ細胞がLT β Rを介した刺激によりケモカインを分泌してリンパ球や樹状細胞の二次リンパ組織への遊走に関与していることが明らかになった¹⁵。二次リンパ組織のストローマ細胞は細胞の隙間をうめて構造を支える「間質としての詰め物」であるばかりでなく、二次リンパ組織の構造を保つための「機能を支持」しているのである。

また近年では細胞観察技術の進歩によりリンパ球動態を生体組織内で観察することが可能となっている。リンパ球がリンパ節内でストローマ細胞のネットワーク構造を足場として移動する様子から、リンパ球が抗原と遭遇するためにもストローマ細胞が重要であることがわかる¹⁶。

3. 人工リンパ組織の構築

筆者らは二次リンパ組織発生に関する内外の研究結果から人工リンパ組織構築に必要な情報を抽出した結果(1)ストローマ細胞とサイトカインを生体適合性高分子材料に組み込んでマウスに移植すれば二次リンパ組織に似た組織を人工的に構築でき、(2)二次リンパ組織の組織構造に類似した組織を構築すれば、適応免疫機能を発揮するはずである、という2つの作業仮説を立てて人工リンパ組織の構築に取り組むことにした。

1) ストローマ細胞、サイトカインと生体適合性高分子材料

人工リンパ組織構築のために最も重要なのはストローマ細胞であることが予測される。現在、筆者らは専らBALB/cマウス胸腺由来ストローマ細胞である TEL-2細胞¹⁷を用いている(注:胸腺は一次リンパ組織である)。TEL-2細胞は二次リンパ組織ストローマ細胞上の重要因子であるLT β RやVCAM-1を発現しているばかりでなく、比較的容易に遺伝子導入発現細胞株を樹立できる

こと、また同系のBALB/cマウスに移植した場合にも腫瘍を形成しないことなど、本研究に使いやすい長所を持ち合わせている。

サイトカインについては、前述のLT α トランスジェニックマウスの実験と「担瘤マウスに癌抗原に対する抗体とLT α の融合タンパクを投与すると癌組織周囲にlymphoid neogenesisが観察される」という報告²¹⁾があったため、マウスのLT α cDNAを導入してLT α 遺伝子発現TEL-2ストローマ細胞株（以下、TEL-2-LT α 細胞）を樹立して用いることにした。

ストローマ細胞の足場となる生体適合性高分子材料として筆者らは市販のコラーゲンスポンジを用いている。これまで何種類かの材料を試した経験からその素材自体の性質、あるいは多孔性のものであればポアサイズも人工リンパ組織構築の効率に少なからず影響を及ぼすと感じている。しかし、生体適合性がありマウスに移植した際に移植局所に過剰な生体反応を引き起こす事のない高分子材料であればいろいろな素材が人工リンパ組織構築に適用可能だろうと考えている。

2) 活性化樹状細胞

1) のTEL-2-LT α 細胞をコラーゲンスポンジに組み込んでBALB/cマウスの腎皮膜下に移植して三週間後に移植組織を回収して免疫組織学的解析を行ったところ、T細胞やB細胞が遊走して集まり小さいフォーカスを形成することが確認された。さらに多くのリンパ球を集積させるために骨髓由来の活性化樹状細胞（活性化DC）をTEL-2-LT α 細胞と共にコラーゲンスポンジに組み込んで同様にマウスの腎皮膜下に移植してみた。するとTEL-2-LT α 細胞のみを移植するよりも活性化DCを併せて移植した方がより多くの移植組織でT細胞やB細胞がクラスター状に集合して明確に区別される細胞群を形成するようになった。この移植組織を詳細に調べてみると二次リンパ組織と良く似た組織構造をもっていることが分った（図1）。以上の結果からストローマ細胞と活性化DCを組織工学的に組み合わせてマウスの腎皮膜下に移植して形成された組織は二次リンパ組織が免疫

組織として機能するために必要な基本的組織構造を有していると判断したのでこの組織を「人工リンパ組織」と呼ぶことにした。

4. 人工リンパ組織での抗原特異的免疫反応

人工リンパ組織で適応免疫反応が誘導できるかどうかを調べるために、胸腺依存性抗原であるNP-OVA（4-hydroxy-3-nitrophenylacetyl-ovalbumin）を用いて抗原特異的な抗体産生細胞が誘導できるかどうかを検討した。実験スケジュールはTEL-2-LT α 細胞と活性化DCをマウスの腎皮膜下に移植して三週間後に抗原を静脈内投与し、その4日後に人工リンパ組織と脾臓を回収して抗原（NP）特異的抗体産生細胞がどの程度誘導されるかをELISPOT（enzyme-linked immunospot）assayで検出した（図2a）。このスケジュールにおいて抗原刺激を加えることができるのは（1）レシピエントであるBALB/cマウスの一次免疫（2）樹状細胞の抗原パルス（樹状細胞を活性化させる際に加える抗原刺激）、及び（3）移植三週間後に抗原を静脈内投与することによる二次免疫、の3つの段階である。この3段階の抗原刺激の有無により誘導されるNP特異的IgG₁抗体産生細胞（NP-IgG₁ AFCと略す）が人工リンパ組織内で最も高率に誘導されるのは、レシピエントマウスの一次免疫と樹状細胞パルスと二次免疫に用いる抗原がすべてNP-OVAの場合であることが分かった。一方、レシピエントマウスがNP-OVAで一次免疫されていない場合とNP-OVAの静脈内投与による二次免疫を受けない場合では人工リンパ組織、脾臓のいずれの組織にもNP-IgG₁ AFCは誘導されなかった。

次に人工リンパ組織で検出されるNP-IgG₁ AFCがレシピエントマウスの正常な二次リンパ組織である脾臓やリンパ節などから遊走して来たのではなく一次免疫であらかじめ抗原刺激を受けたリンパ球が人工リンパ組織を構成しその場所で効率良くNP-IgG₁ AFCにクラススイッチしたのかどうかを調べるために「再移植」実験を行った（図2

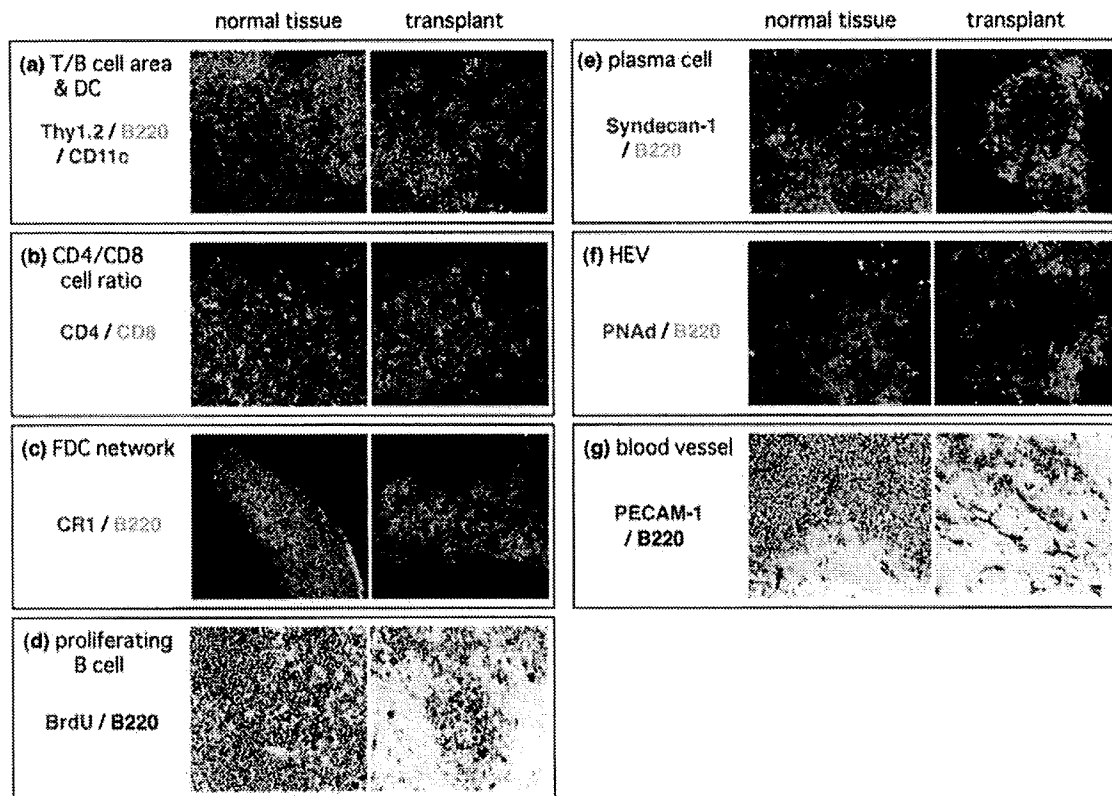


Figure 1

Tissue-engineered transplants (right) have structure similar to secondary lymphoid organs (left). (a) LN and transplant stained for Thy1.2 (T cells), B220 (B cell), and CD11c (dendritic cells). (b) Immunostaining of lymph node (LN) and transplant tissue using mAbs for CD4 T cell and CD8 T cell. (c) LN and transplant stained for CR1 (FDC maker) and for B220. (d) LN from immunized mice and transplant stained for BrdU (bromodeoxyuridine) and B220. Actively proliferating B cells were shown as double positive cells for BrdU and B220. (e) Spleen and transplant stained for Syndecan-1 (plasma cell marker) and B220. (f) LN and transplant stained for PNAd (one of the HEV-specific adhesion molecules) and B220. (g) Spleen and transplant stained for PECAM-1 (adhesion molecule expressed on endothelial cells of blood vessel) and B220.

(Suematsu S and Watanabe T: Nature Biotech 22:1539, 2004²⁹⁾)

b)。NP-OVAで一次免疫されたBALB/cマウスの腎皮膜下にTEL-2-LT α 細胞とNP-OVAをパルスした活性化DCを移植して構築した人工リンパ組織を回収し、別のマウスの腎皮膜下に「再移植」する。そして再移植後数日以内にレシピエントマウスにNP-OVAを静脈内投与して4日後に脾臓と人工リンパ組織を回収しELISPOT assayによりNP-IgG₁ AFCの数を調べた。その結果、免疫刺激を受けた事のないBALB/cマウスに再移植した場合、脾臓にはNP-IgG₁ AFCが検出されなかつ

たのに対し再移植された人工リンパ組織には多数のNP-IgG₁ AFCが存在する事が分かった。また、抗体産生能のない重症複合型免疫不全症 (SCID) マウスに再移植した場合にもNP-OVAの静脈内投与4日後には血中にNP特異的なIgG₁抗体が検出された。これらの事より (1) 人工リンパ組織は他のマウスに移植可能であり (2) 人工リンパ組織に存在するNP-IgG₁ AFCは他のリンパ組織から遊走してきたものではなく、確かに人工リンパ組織内でNP-OVAの二次免疫刺激によりIgG₁抗

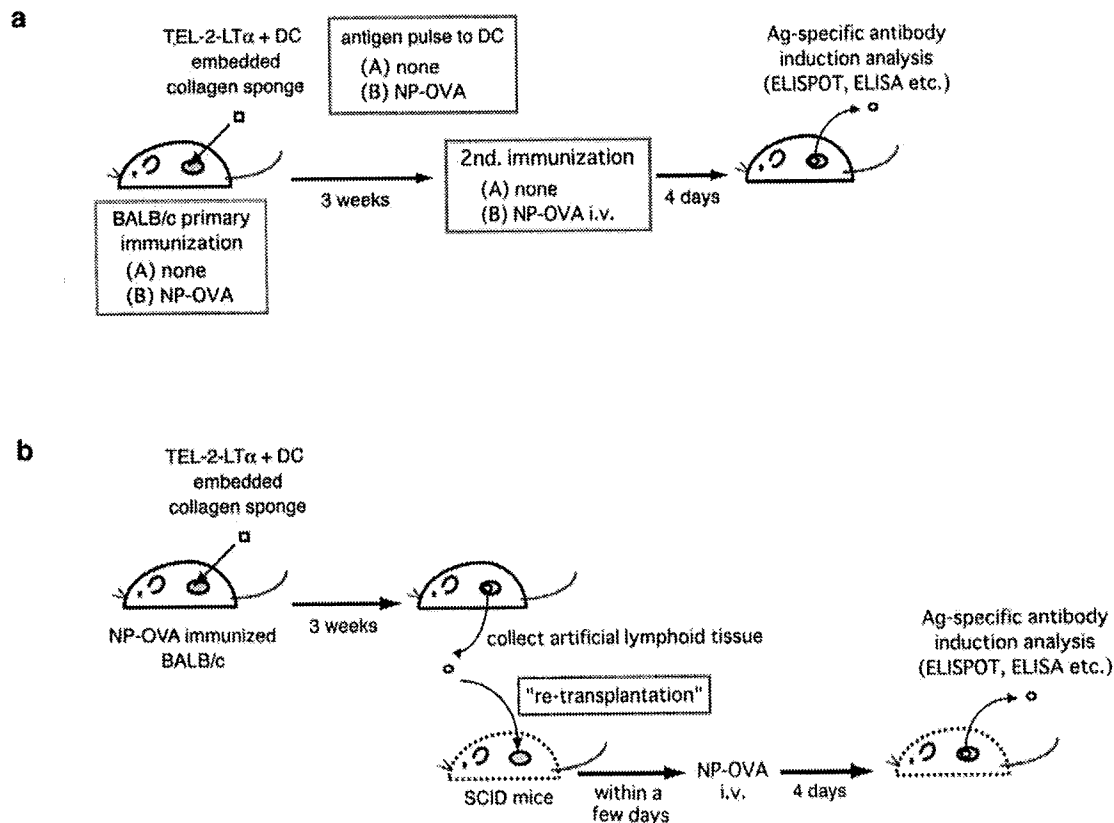


Figure 2

Antigen-specific antibody induction by artificial lymphoid tissue. a. Experimental design and schedule for detection of antigen-specific antibody induction. b. "re-transplantation" experiment to show antigen-specific IgG antibody induction in artificial lymphoid tissue, not in the spleen of the recipient SCID mice. The result shows transplantability of artificial lymphoid tissue and its adaptive immune function to immunodeficient mice.

(Suematsu S and Watanabe T: Nature Biotech 22:1539, 2004²³⁾)

体産生細胞にクラススイッチした事が明らかとなった^{23, 24)}。

おわりに

筆者らはTEL-LT α ストローマ細胞と活性化DCをコラーゲンスポンジに吸着させてマウスの腎皮膜下に移植する事により、移植後三週間で二次リンパ組織の基本構造を備えた組織を人工的に構築する方法を確立し、人工リンパ組織内において抗原特異的な抗体産生細胞が誘導できること、また他の個体に移植した場合にも抗原特異的な免疫反応を速やかに誘導できることを示した。

活性化DCをTEL-2-LT α 細胞と共に移植することによって効率良く人工リンパ組織を構築できることが分かったが、筆者らはTEL-2-LT α 細胞が中心的な役割を果たしていると考えている。なぜなら形成されるT細胞クラスターの数と大きさで判定すると、移植する細胞によって人工リンパ組織構築の効率がTEL-2-LT α 細胞 + 活性化DC > TEL-2-LT α のみ >> 活性化DCのみ、の順に低下したからである。おそらくTEL-2-LT α 細胞が活性化DCとの相互作用によりケモカインや接着因子を発現するか、あるいはサイトカインを発現して間接的に周囲の他のストローマ細胞にケモ

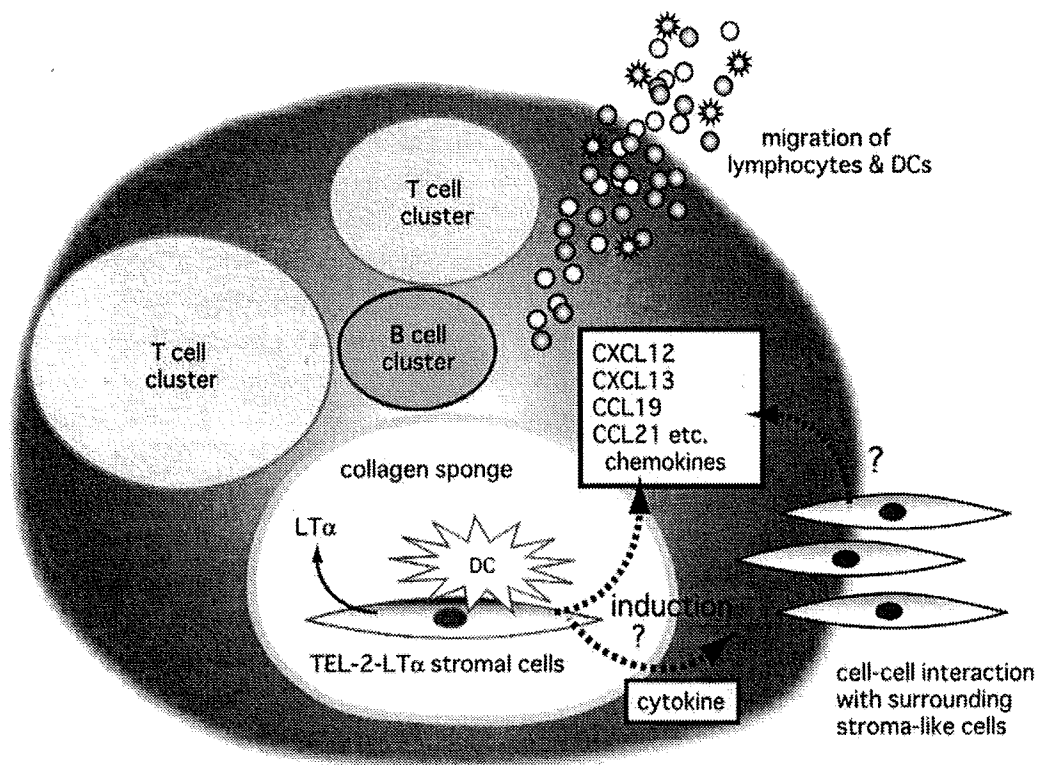


Figure 3

Mechanism of artificial lymphoid tissue construction. It is presumable that TEL-2 stromal cell is induced to express molecules attracting lymphocytes through interaction with activated dendritic cells

カイン分泌を誘導してリンパ球や樹状細胞を遊走させるのではないかと考えている(図3)。遊走してきた細胞がTEL-2-LT α 細胞や他の細胞に作用する事によってさらにこの過程は増強されるのであろう。また、遺伝子を導入していないTEL-2細胞とTEL-2-LT α 細胞を比較すると構築される組織構造には大きな差が見られなかったため、我々の人工リンパ組織構築の方法においてTEL-2細胞からのLT α の発現が必須条件であるとは考えにくい。人工リンパ組織の構築を可能にしたのがTEL-2細胞に特異的な性質なのか、あるいは他のストローマ細胞とも共通する何らかの因子によるのかは今の所は不明であるが、活性化DCとの相互作用によるTEL-2細胞でのサイトカインや接着因子の発現誘導を他のストローマ細胞と比較しながら調べている最中である。

筆者らの人工リンパ組織構築は炎症のプロセスにもよく似ている。また、構築方法が比較的単純であることから、このシステムを用いることによって二次リンパ組織の恒常性や炎症反応のプロセスを規定している新しい因子を見つける事ができるかもしれない。このように常に細胞が出入りし、ダイナミックに変化し続ける二次リンパ組織に類似した組織を自由に構築できるようになったことで今までの遺伝子改変マウスを用いた研究とは全く異なる新しい研究ツールとなると考えている。

最後に、人工リンパ組織を免疫不全マウスに移植した場合にも投与した抗原に対して速やかに効率良く抗原特異的免疫反応が誘導できるということは、将来的には新たな免疫賦活法としてヒトの免疫不全状態や難治性感染症の治療に応用することも不可能ではないであろう。癌に対する新しい

免疫細胞療法として利用することができるかもしれない。免疫不全マウスが人工リンパ組織によって病原微生物を排除して感染症から回復するのかどうかを調べることから始めると共に、ヒト型人工リンパ組織の構築も視野に入れて今後の研究を進めることを計画している。

謝辞

本稿で紹介した人工リンパ組織構築の研究は九州大学生体防御医学研究所の渡邊武教授の研究室において2000年から始めたものであり、2004年4月に渡邊先生と共に異動した横浜理化学研究所では1年間研究を行った。その後、2005年4月に現所属の独立行政法人医薬基盤研究所に移ってから一貫して人工リンパ組織の臨床応用を最終目的として研究を続けている。九州大学在職時には、医用工学の松田武久教授から生体適合性高分子材料と多くの助言を頂いた。ここに両先生はじめ多くの方々深く感謝いたします。

引用文献

- 1) Miyasaka M and Tanaka T. Lymphocyte trafficking across high endothelial venules: dogmas and enigmas. *Nat Rev Immunol* 4: 360-370, 2004
- 2) Fu Y-X and Chaplin DD. Development and maturation of secondary lymphoid tissues. *Ann Rev Immunol* 17: 399-433, 1999
- 3) Magerling G, Hopken UE, and Lipp M. The impact of CCR7 and CXCR5 on lymphoid organ development and systemic immunity. *Immunol Rev* 195: 117-135, 2003
- 4) Cyster JG. Chemokines, sphingosine-1-phosphate, and cell migration in secondary lymphoid organs. *Annu Rev Immunol* 23: 127-159, 2005
- 5) Cyster JG. Chemokines and cell migration in secondary lymphoid organs. *Science* 286: 2098-2102, 1999
- 6) Mebius RE. Organogenesis of lymphoid tissues. *Nat Rev Immunol* 3: 292-303, 2003
- 7) De Togni P, Goellner J, Ruddle NH, et al. Abnormal development of peripheral lymphoid organs in mice deficient in lymphotoxin. *Science* 264: 703-707, 1994
- 8) Shinkura R, Kitada K, Matsuda F, et al. Alymphoplasia is caused by a point mutation in the mouse gene encoding Nf-kb-inducing kinase. *Nat Genet* 22: 74-77, 1999
- 9) Nakano H and Gunn MD. Gene duplications at the chemokine locus on mouse chromosome 4: multiple strain-specific haplotypes and the deletion of secondary lymphoid-organ chemokine and EBI-1 ligand chemokine genes in the plt mutation. *J Immunol* 166: 361-369, 2001
- 10) Gunn MD, Kyuwa S, Tam C, et al. Mice lacking expression of secondary lymphoid organ chemokine have defects in lymphocyte homing and dendritic cell localization. *J Exp Med* 189: 451-460, 1999
- 11) Kratz A, Campos-Neto A, Hanson MS, and Ruddle NH. Chronic inflammation caused by lymphotoxin is lymphoid neogenesis. *J Exp Med* 183: 1461-1472, 1996
- 12) Fan L, Reilly CR, Luo Y, Dorf ME, and Lo D. Cutting edge: ectopic expression of the chemokine TCA4/SLC is sufficient to trigger lymphoid neogenesis. *J Immunol* 164: 3955-3959, 2000
- 13) Luther SA, Lopez T, Bai W, Hanahan D, and Cyster JG. BLC expression in pancreatic islets causes B cell recruitment and lymphotoxin-dependent lymphoid neogenesis. *Immunity* 12: 471-481, 2000
- 14) Chen S-C, Vassileva G, Kinsley D, et al. Ectopic expression of the murine chemokines CCL21a and CCL21b induces the formation of lymph node-like structures in pancreas, but not skin, of transgenic mice.

- J Immunol 168: 1001-1008, 2002
- 15) Luther SA, Bidgol A, Hargreaves DC, et al. Differing activities of homeostatic chemokines CCL19, CCL21, and CXCL12 in lymphocyte and dendritic cell recruitment and lymphoid neogenesis. *J Immunol* 169: 424-433, 2002
 - 16) Drayton DL, Ying X, Lee J, Lesslauer W, and Ruddle NH. Ectopic L_Tα directs lymphoid organ neogenesis with concomitant expression of peripheral node addressin and a HEV-restricted sulfotransferase. *J Exp Med* 197: 1153-1163, 2003
 - 17) Drayton DL, Liao S, Mounzer RH, Ruddle NH. Lymphoid organ development: from ontogeny to neogenesis. *Nat Immunol* 7:344-353, 2006
 - 18) Endres R, Alimzhanov MB, Plitz T, et al. Mature follicular dendritic cell networks depend on expression of lymphotoxin b receptor by radioresistant stromal cells and of lymphotoxin b and tumor necrosis factor by B cells. *J Exp Med* 189: 159-168, 1999
 - 19) Ngo VN, Korner H, Gunn MD, et al. Lymphotoxin α/β and tumor necrosis factor are required for stromal cell expression of homing chemokines in B and T cell areas of the spleen. *J Exp Med* 189: 403-412, 1999
 - 20) Bajéoff M, Egen JG, Qi H, Huang AY, Castellino F, Germain RN. Highways, byways and breadcrumbs: directing lymphocyte traffic in the lymph node. *Trends Immunol* 28:346-352, 2007
 - 21) Nakashima M, Mori K, Maeda K, et al. Selective elimination of double-positive immature thymocytes by a thymic epithelial cell line. *Eur J Immunol* 20: 47-53, 1990
 - 22) Schrama D, Straten P, Fischer WH, et al. Targeting of lymphotoxin-α to the tumor elicits an efficient immune response associated with induction of peripheral lymphoid-like tissue. *Immunity* 14: 111-121, 2001
 - 23) Suematsu S and Watanabe T. Generation of a synthetic lymphoid tissue-like organoid in mice. *Nat Biotech* 22: 1539-1545, 2004
 - 24) Okamoto N, Chihara R, Shimizu C, Nishimoto S, Watanabe T. Artificial lymph nodes induce potent secondary immune responses in naive and immunodeficient mice. *J Clin Invest* 117:997-1007, 2007

蛋白療法の最適化に叶う創薬基盤技術の開発とその評価

第9回日本 DDS 学会永井賞受賞によせて

Drug delivery systems for proteomics-based drug innovation: the 9th Nagai Award in the 25th Annual Meeting of the Japan Society of Drug Delivery System
Yasuo Tsutsumi*

わが国の五人疾患や種々難病に対する次世代創薬を志向したプロテオミクス研究(創薬プロテオミクス研究)は、(1) 病態情報を迅速かつ確に集積・評価できる「疾患バイオマーカー候補蛋白質」や「疾患の発症・悪化に関わる創薬ターゲット候補蛋白質」、さらには「疾患の治療に関わる医薬品シーズ候補蛋白質」の同定、(2) 医薬品の有効性・安全性を高度に予測・解析できる「薬物治療バイオマーカー候補蛋白質」の同定、(3) これら候補蛋白質を有効活用した画期的診断・治療法の開発にフォーカスされている。

一般に、疾患の発症や悪化あるいは医薬品の有効性・毒性発現の際には、数百種類以上もの蛋白質が、質的・量的・時空間的に発現変動している。そのため、創薬プロテオミクス研究の成功の鍵は、① 数多くの発現変動蛋白質のなかから、バイオマーカーや創薬ターゲット/医薬品シーズとなりうる候補蛋白質を絞り込むこと、② バイオマーカー蛋白質や創薬ターゲット/医薬品シーズ蛋白質をいかに医療現場や医薬品開発へ有効活用していくか、ということに尽きる。世界的にみて、プロテオミクスをはじめとするオミクス研究の成功例が乏しいのは、上記①および②を実現するための基盤技術が未成熟であることにはかならない。この点、筆者らが開発を進めている“抗体プロテオミクス技術”は、①に示した「候補蛋白質の絞り込みとバリデーション」を同時に実現できる独自の基盤技術であり、創薬プロテオミクス研究の推進や抗体医薬の開発などに大きく貢献できる可能

性を秘めている。一方で、①で見いだした、抗体やサイトカインなど、疾病治療に有用な医薬品シーズ蛋白質を医薬品として開発しようとした場合、体内安定性の乏しさや作用の多様性といった蛋白質固有の問題点を克服するための DDS 技術の開発が鍵となる。

この点、筆者らは、レセプター指向性のアゴニスト(ターゲティング能を有した機能性人工蛋白質)の迅速作製技術(生物学的 DDS)や部位特異的高分子バイオコンジュゲーション技術(高分子化学的 DDS)を新たに確立し、医薬品シーズ蛋白質の有効性と安全性を格段に向上できることを見いだしている。また、創薬ターゲット蛋白質に対する医薬品開発の鍵は、これらに対する有効な阻害分子をいかに迅速創出できるかである。この点でも筆者らは、前述の生物学的 DDS を駆使し、創薬ターゲット蛋白質に対する structural variants(構造変異蛋白質)を、1 億種類以上もの多様性を持ったファージライブラリとして構築することで、このなかからレセプター指向性(ターゲティング能)を有する「アンタゴニスト活性を有する機能性人工蛋白質」の創出にもはじめて成功している。

本稿では、以上に概略を記載した、創薬プロテオミクス研究の実現に叶う独自の DDS 研究に関して、筆者らの最新の知見を紹介させていただく。

ヒトゲノム解読が完了し、「ヒトの設計図」は2 万数千種類の遺伝子で描かれていることが明らかとなった。RNA として機能する例外を除き、これら遺伝子の機能を具現するのは、最終産物である蛋白質である。この蛋白質は、「翻訳調節や翻訳後修飾」を受けるため、mRNA と蛋白質の間には、多くの場合、量的な相関関係は成立しない。特に、蛋白質の酸化的修飾やリン酸化等に伴う“蛋白質の機能変化・異常”は、後天的な疾患の発症や悪化の主因となっている。そのため先天的な遺伝子疾患など

*1) Department of Toxicology, Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Osaka University 大阪大学大学院薬学研究科・毒理学分野

*2) Laboratory of Pharmaceutical Proteomics, National Institute of Biomedical Innovation 独立行政法人医薬基盤研究所・創薬プロテオミクスプロジェクト

を除き、病態メカニズムなどを解明しようとするライフサイエンス研究では、遺伝子(ゲノム・トランスクリプトーム)の解析研究だけでは不十分であり、蛋白質(プロテオーム)の解析研究、すなわちプロテオミクスへの期待が高まっている¹⁾。

プロテオームとは、細胞・個体の生命活動に必要な全蛋白質をひとまとめに捉えた概念であり、細胞や個体で発現している遺伝子(ゲノム)産物、すなわち蛋白質の総和(集合体)を示している。すなわちプロテオームは、細胞・個体中で翻訳され、部分的消化や翻訳後修飾などを受け、種々生体内分子と相互作用しつつ、機能している全発現蛋白質を意味している。周知のとおり、ゲノムは単なる情報(遺伝型)に過ぎず、このゲノム情報に基づき、多様な蛋白質群(表現型)が作られることで、生命体ははじめて生命現象が営める。したがってプロテオームには、組織や細胞の状態(分化・老化・疾患)を反映した情報が濃縮されていることになる。

細胞や個体においては、約2万数千種類の遺伝子の翻訳産物が種々修飾を受け、結果として10万種類以上にも及ぶ蛋白質として存在しうものと考えられており、このうち一部(数千~5千種類)が機能的に発現しているものと推定されている。これら発現蛋白質の「種類(質)」や「量」、「時空間的な局在性」を網羅的に(動態)解析することで、健常状態における挙動とは異なった蛋白質を探索し、分化や老化といった生命現象や、疾患の発症や悪化に関連する蛋白質群を見だし、細胞や個体の状態(分化・老化・病態)情報を理解しようとする研究が、プロテオーム解析(プロテオミクス)であり、生命現象や種々疾患の解明のみならず、得られた情報・知見を活用し、安全性と有効性にすぐれた医薬品の開発などに展開していくことが期待されている。

なお、生体防御機構といった「生体が生まれながらに兼ね備えている恒常性維持機構」を、発現蛋白質の動態解析の視点で眺めようとするプロテオミクスは、DDSの観点から考えると、見事なまでの天然のDDSを学び取ろうとするものであり、筆者らのグループが目指している究極のDDSはプロテオミクス研究といった「生体が本来的に有している巧妙な仕組み」を総合的に理解しようとする試みから産み出されるものと信じている。

このようなプロテオミクス研究のなかでも、(1)疾患の発症や悪化、がんのステージ移行(がん転移、がん浸潤)といった病態の推移や合併症の発症、医薬品の効果(治療度合い)や副作用、有害事象を予測・評価できる創薬バイオマーカー(疾患バイオマーカーおよび薬物治療バイオマーカー)の探索、(2)疾患の発症や悪化に関与している創薬ターゲットあるいは疾患の治療に関わる医薬品シーズとなる蛋白質の探索は、資源に乏しく、知的創発に頼らざるを得ないわが国にとって、国民の健康と福祉の向上のみならず、知的財産立国(知財立国)・技術立国を標榜していくためにも、ライフラインと位置づけられている。しかしながら、ゲノミクス・トランスクリプトミクス研究で欧米に出遅れたわが国は、上記の創薬プロテオミクスにおいても、ゲノム創薬以上に立ち後れているのが現状であり、創薬プロテオミクス研究の推進は、まさに緊急命題となっている。

創薬プロテオミクス研究の現状

がん、糖尿病、高血圧、痴呆症、アレルギー性・炎症性免疫疾患といったわが国の五大疾患や種々難病に対する“創薬バイオマーカー”や“創薬ターゲットあるいは医薬品シーズ”の探索は、臨床現場で最適医療を提供するだけでなく、安全・安心かつ有効な医薬品の開発に際しての圧倒的な競争力の獲得に直結するため、これまでに類をみないほどに、熾烈な国際競争が繰り広げられている。なかでも、米国やドイツ、スイスなど、欧米各国はすでに、2000(平成12)年以降、大量の国家予算を投じ、メガファーマやバイオベンチャーを巻き込んで、創薬プロテオミクス研究に大規模着手している。

ゲノム創薬で出遅れたわが国にとって、これは深刻な状況であり、この劣勢を挽回し、国際競争力に満ち溢れた画期的な医薬開発を支援することを目的に、2003(平成15)年、厚生労働省および国立医薬品食品衛生研究所(2005年以降は、独立行政法人医薬基盤研究所)が中心となり、製薬メーカー22社、5カ所のナショナルセンター(国立循環器病センター、国立精神・神経センター、国立国際医療センター、国立成育医療センター、国立長寿医療研究セ

ンター), 大阪大学医学部, 大阪大学蛋白質研究所といった産官学が強固に連携し, 国家プロジェクト『疾患関連蛋白質解析研究事業』がスタートした。

本研究事業は, わが国の主要疾患などに関して,

- ⑦ 患者(薬物治療中の患者を含む)と健常人との間で, 質的, 量的, 時空間的に発現変動している蛋白質(疾患関連蛋白質)を(動態)解析し, ⑧ 数多く(数百種類以上)の発現変動蛋白質のなかから, 疾患バイオマーカーや創薬ターゲットあるいは医薬品シーズとなりうる蛋白質を絞り込み, ⑨ これらをバリデーションしたうえで, ⑩ 新規医薬品の創出などに有効活用しようとするものである。当事業は, 2008(平成20)年度より, 第2期事業に移行し, ⑪ 医薬品等の毒性発現に起因して発現変動する安全性バイオマーカーの同定と安全な医薬品の開発支援をも目指した『創薬バイオマーカー探索研究事業』として再スタートしている。

抗体プロテオミクス技術

しかし残念ながら, 世界的にみても, 創薬プロテオミクス研究に成功した例は, いまだ数少ないのが現状である。これはまず, 疾患の発症や悪化・進展, 医薬品の有効性あるいは毒性発現の際には, 細胞・個体内に存在している蛋白質(数千類)のうち, 数百種類以上もの蛋白質が, 質的, 量的, 時空間的に発現変動し, このなかから, 本当に意味(価値)のある「創薬バイオマーカーや創薬ターゲット/医薬品シーズ」の候補となる蛋白質を絞り込まねばならないことに起因している。すなわち, 候補蛋白質の絞り込みを実現していくためには, 数多くの発現変動蛋白質の機能・局在化解析と病態・薬効・毒性との連関追求が不可欠であり, ほとんどの場合, 個々の発現変動蛋白質に対して各々のモノクローナル抗体を作製して解析することが必須となる。

そのため, 極端なことをいえば, 千種類の発現変動蛋白質が探索されてきた場合, 千種類のモノクローナル抗体を作製せねばならないことになってしまう。一般にモノクローナル抗体作製には, わずか一種類の蛋白質を対象としたときですら, マウスなどの動物への免疫やハイブリドーマの作製, スクリーニングなどのステップが必要であり, 多くの場

合, 半年以上も要してしまう。これは, 創薬プロテオミクスに限らず, ゲノミクス・トランスクリプトミクスといった創薬を志向したオミクス研究全般に当てはまることであり, その結果, 画期的創薬などのアウトプットが皆無に等しい現状を招いてしまっている。

また, 上記の抗体作製に関する諸課題を克服し, 「創薬バイオマーカーや創薬ターゲット/医薬品シーズ」の候補蛋白質が絞り込まれたあとには, 疾患情報(疾患の発症や悪化[ステージ], 症状[たとえばがんの組織浸潤や転移の有無, 合併症の併発, 予後など])や薬効情報(たとえば抗がん剤の有効性[著効, 有効, 無効]や耐性といった情報), 有害事象の情報(毒性発現の有無など)と, 候補蛋白質の発現様式との連関をバリデーションし, 有用な「創薬バイオマーカーや創薬ターゲット/医薬品シーズ」を同定せねばならない。しかし, このバリデーションに関しても, 膨大な数の臨床検体数に頼らざるをえないのが現状であり, わが国をはじめとして, 創薬を志向したオミクス研究の大きな足枷となっている。

この点, 筆者らは最近, 理論上あらゆる抗原に対する抗体を含んだ独自のファージ抗体ライブラリ(24億種類もの抗体の多様性を有している)を開発するとともに, プロテオーム解析サンプルから直接回収される微量(0.5ng程度)かつ多種類の変動蛋白質から, おのおのの特異的モノクローナル抗体をわずか2週間程度で単離できる方法を考案した。得られたファージ抗体は, ELISAや病理切片などの免疫染色をはじめとする機能解析に展開可能である。

筆者らは現在, 病態ステージ, 予後, 転移・薬効といった臨床情報既知で, かつ1,500症例以上のヒト病態・正常組織がスポットされた組織アレイ(富山大学医学部 福岡順也博士との共同研究)を用い, バリデーションを一挙に実施している。

このヒト臨床検体の前処理から, プロテオーム解析による発現変動蛋白質の同定, 抗体作製とバリデーションまでの過程を, 約2~3週間で完了できるシステムを, 筆者らは「抗体プロテオミクス技術」とよんでいる(図1)。この抗体プロテオミクス技術は, 多数の変動蛋白質を質量分析器で同定すると同時に, その特異的モノクローナル抗体をおの

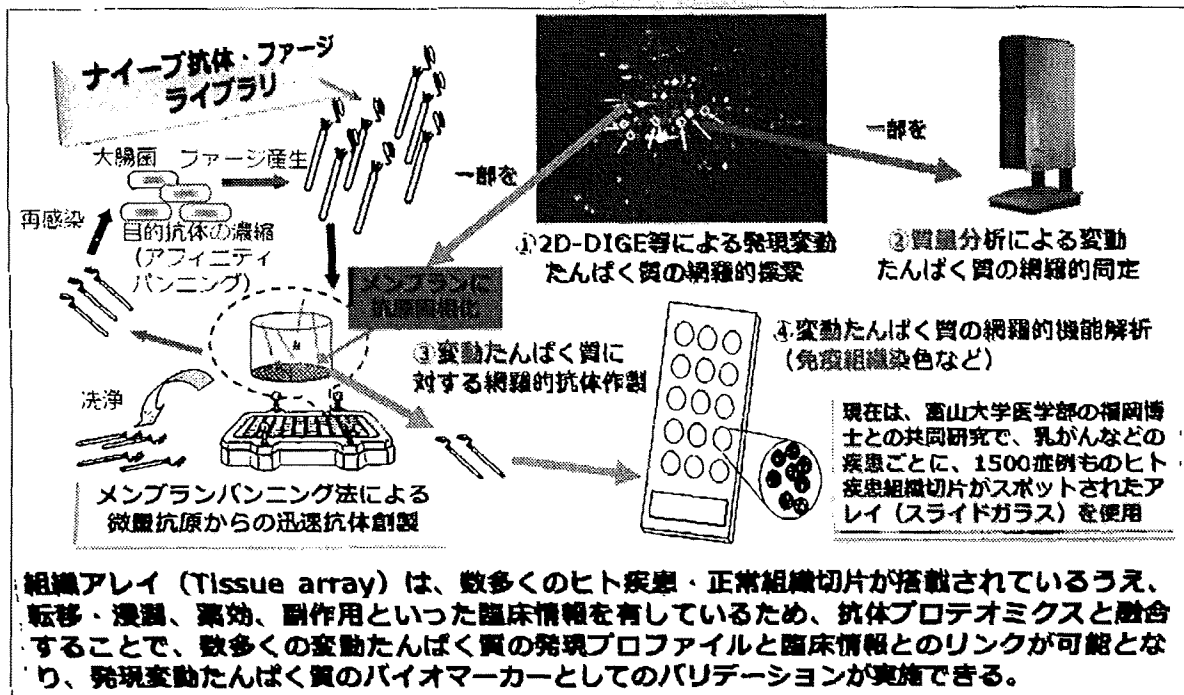


図1 抗体プロテオミクス技術による創薬バイオマーカー蛋白質の探索

ファージ抗体ライブラリによる *in vitro* 抗体作製法をプロテオミクスに応用することで、これまで達成困難であった 2D-DIGE spot 中の微量で多数の発現変動蛋白質に対する網羅的な抗体作製を実現し、多数の発現変動蛋白質のハイスループットなバリデーションが可能となった。

おの作製し、臨床情報を豊富に搭載した“多数のヒト症例”に対し、一挙かつリアルタイムにバリデーションできる唯一の方法であり、先述した創薬プロテオミクス研究の諸問題を解決できるなど、他を圧倒する競争力を有している。

現在、乳がん・大腸がん・肺がんなどを対象に、産官学の連携のもと、抗体プロテオミクス研究を推進しており、いくつかの興味深いバイオマーカー蛋白質を見いだしている。

ファージ表面提示法を利用した生物学的 DDS

創薬プロテオミクス研究の成果を社会に還元していくためには、人間ドックなどの機会を利用しつつ、迅速かつ的確な病態診断により疾患予備軍の健康コントロールを図るとともに、オーダーメイド医療をも視野に入れた、適切かつ安心できる治療(投薬)計画の立案、さらに治療モニタリングに有用な診断薬・技術の開発が必須となる。この点、臨床情報とリンクした創薬バイオマーカーは、国民の健康

そして医療現場にパラダイムシフトをもたらすものであろう。

また、製薬メーカーやバイオベンチャーにおいては、新規産業シーズの獲得と、開発段階から高度に有効性と安全性が保証された画期的医薬品の開発を強力にサポートするであろう。一方で、医薬品シーズ/創薬ターゲットとなる蛋白質を有効活用した創薬に関しては、すでに数多くの事例が物語っているように、有効性と安全性を高度に保証していこうとする観点から、DDSの重要性がますます高まってくるものと考えられる。

ここでは、筆者らの種々DDS研究のなかから(図2)、自己免疫疾患の発症・悪化における創薬ターゲット(腫瘍壊死因子: TNF)を1例に、創薬プロテオミクス研究の成果を有効活用しようとするDDSについて紹介する。

慢性関節リウマチや多発性硬化症などの自己免疫疾患は、いまだ克服すべき難病の一つとして広く認識されている。そのため、自己免疫疾患を標的とした創薬プロテオミクス研究が盛んに行われており、

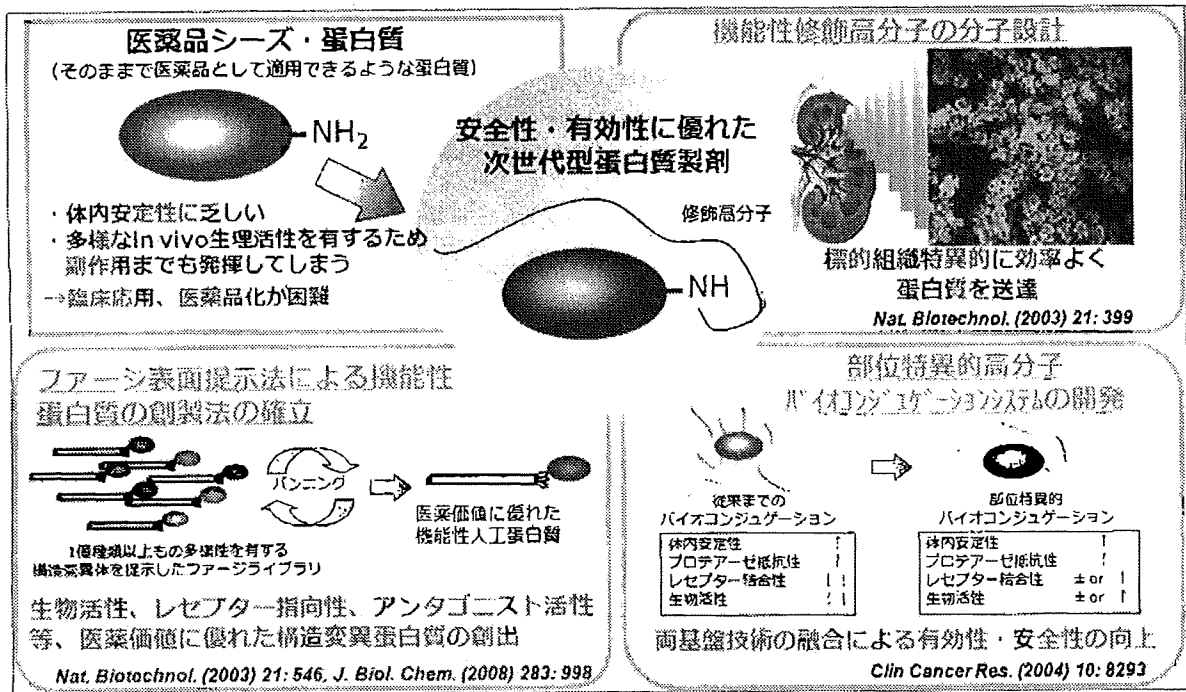


図2 創薬プロテオミクスの実現に向けた“生物学的DDS”と“高分子化学的DDS”の融合

ファージ表面提示法を駆使することにより、目的の受容体に選択的に結合可能な構造変異蛋白質の創出技術とリジン欠損構造変異蛋白質のN末端特異的な高分子バイオコンジュゲーションシステムの開発を実現し、これまで蛋白質の医薬品化において問題となっていた複数の受容体を介した多様な生理作用による副作用発現と、体内安定性の乏しさによる大量頻回投与を一挙に克服することが可能になった。

広範な炎症の惹起・悪化における key molecule の一つとして、腫瘍壊死因子(TNF)が創薬ターゲットとなっている⁴⁻⁶⁾。一方でTNFは、発がんや種々感染症に対する生体防御活性の中心を担っていることも明らかとなっているが、病態(炎症)の発症・悪化と生体防御活性の発揮とのバランスやその調節メカニズムは、いまだ不明のままである。特にTNFの生体における2種類の存在形式(可溶性TNFと膜結合型TNF)の意義(役割分担)に加え、これらTNFに対する2種類の異なるレセプター(TNFR1およびTNFR2)を介した機能の相違等は十分に理解されていない。

現在、慢性関節リウマチに対する特效薬として、TNFに対する中和抗体や可溶性TNFレセプターが、臨床に供されている。これは投与した中和抗体や可溶性レセプターと、生体内に存在するTNFとの間で複合体を形成させ、内因性TNFのすべての活性を遮断する(内因性TNFを枯渇させる)ものである。これら抗TNF蛋白質医薬は、リウマチ患者の

QOLを格段に向上させるなど、切れ味鋭い治療成績を発揮している^{5,6)}。しかし上述のように、TNFは本来、宿主の生体防御機構に重要な役割を担っているため、これら抗TNF蛋白質医薬の使用は、結核などの感染症や発がんに対する宿主の抵抗性を減弱させてしまい、臨床現場における大きな懸念事項となっている^{7,8)}。事実、今後の科学的検証を必要とするものの、本邦において2007年12月に抗TNF蛋白質医薬投与患者における死亡例が報告されている(因果関係などの詳細を精査する必要あり)。また自己免疫疾患のなかでも、多発性硬化症では、これら抗TNF蛋白質医薬の使用は禁忌となっている⁹⁾。

前述したように、TNFが結合するレセプターにはTNFR1とTNFR2が存在し、各レセプターが可溶性/膜結合型TNFと作用しつつ、非常に複雑かつ巧妙にその生体内反応が、正負に制御されている。筆者らは現在、病態の発症や悪化に関わるTNF/TNFR結合のみを選択的に阻害できる抗TNF蛋白質医薬(TNFによる宿主の生体防御機構を

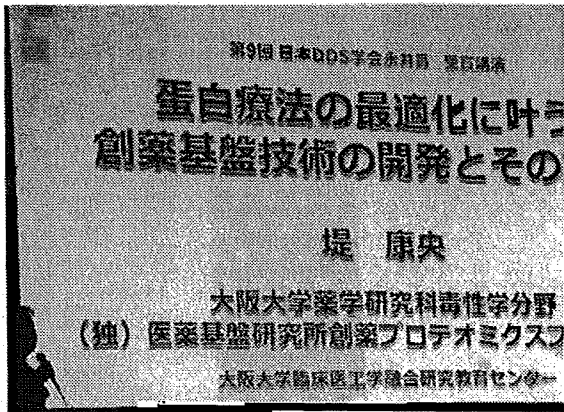


図3 受賞講演

保持したまま、自己免疫疾患を治療できる蛋白医薬)の開発を目指して、可溶性/膜結合型 TNF の TNFR1 もしくは TNFR2 を介した機能を解析し、宿主の生体防御機構や種々炎症反応の惹起・鎮静との連関追求を、産官学の共同研究で実施しており、興味深い知見を集積しつつある。

また、過去のいくつかの報告にもみられるように、可溶性 TNF の TNFR1 を介した過剰な活性発現が炎症反応の惹起・悪化に、可溶性/膜結合型 TNF の TNFR2 を介した活性発現がウイルス感染防御や多発性硬化症の抑制に関与していることが明らかとなりつつある¹⁰⁻¹²⁾。これは、可溶性 TNF の TNFR1 を介した活性発現を選択的に阻害することができれば、慢性関節リウマチのみならず、多発性硬化症などの自己免疫疾患にも有用かつ安全な医薬品が開発可能であることを示唆するものである。

この点、筆者らはこれまでに、ファージ表面提示法を独自に改良することにより 10^8 (1 億) 種類以上もの多様性を有した構造変異蛋白質(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のなかから、レセプター親和性(選択性/特異性)や体内安定性、生物活性を向上あるいは任意に制御した“機能性人工蛋白質”を迅速(2 週間以内)かつ効率よく創出できる「蛋白質分子進化システム」を確立している。

本システムは、血中安定性の向上に加え、生物学的改変により特定のレセプターへのターゲティングを蛋白質に付与できる点で、分子レベルの DDS であり、いわば蛋白医薬による疾病治療の最適化



図4 永井恒司先生からの賞状授与

を目指した“生物学的 DDS”と位置づけられる。そこで本創薬(DDS)テクノロジーを用い、TNFR1 特異的なアンタゴニスト(TNF 変異体)の創出を目的に、TNF の構造変異体ライブラリを網羅的に作製、スクリーニングしたところ、「TNFR2 とは結合せず、TNFR1 に対してのみ野生型 TNF と同等の結合親和性を示す TNFR1 指向性アンタゴニスト(TNF-T2)」を先駆けて創出した。

これまで、生理活性蛋白質の構造変異体が野生型蛋白質により発現する生物活性に対してアンタゴニスト活性を示すという概念すらなく、この「蛋白質アンタゴニスト」ともいふべき TNFR1 指向性アンタゴニストの創出は、独自に構築した基盤テクノロジーを応用することではじめてなしたものである。さらに、N 末端部位特異的に修飾高分子 PEG を導入した PEG 化 TNF-T2(PEG-T2)が、野生型 TNF-T2 と比較して、*in vitro* におけるアンタゴニスト活性を低下することなく、血中滞留性が飛躍的に増大していることを見いだしている。なお、この革新的な部位特異的バイオコンジュゲーション(高分子化学的 DDS)は、前述した生物学的 DDS によって機能性リジン欠損蛋白質を創製することではじめて実現可能になるものであり、両テクノロジーの融合で、従来法の諸問題の克服に成功したものである。

この PEG-T2 は、マウスレベルでの実験において、既存の抗 TNF 蛋白医薬で致命的な問題になっ

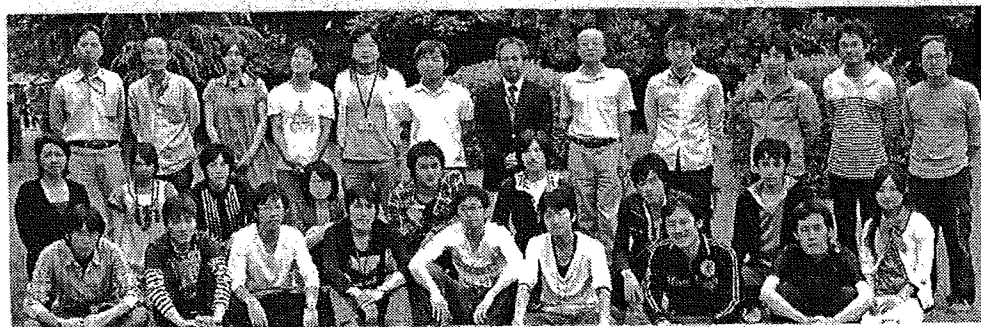


図5 ラボのメンバー

ていた宿主の感染防御能の低下を招くことなく、安全に、しかも種々肝炎や関節炎に対して治療効果を発揮すること、そのうえ、いまだ治療薬のない多発性硬化症においても副作用を示すことなく、有効性を発揮することが判明している。すなわち、TNF-T2はTNFR1を介した作用を選択的に阻害することで、生体防御機構の破壊を招くことなく、治療効果を発揮できることから、安全かつ有効な自己免疫疾患治療薬となりうることが示された。現在、TNF-T2のさらなる有用性を評価すべく、他の自己免疫疾患モデルに対しての治療実験を進めるとともに、霊長類レベルで医薬品化(関節リウマチおよび多発性硬化症を対象)を目指した研究ステージに移行している。

おわりに

以上、足早ではあるが、本稿では、第25回日本DDS学会学術集会(理事長：橋田 充先生、大会長：松村保広先生)での受賞講演(第9回日本DDS学会永井賞、座長：塚越 茂先生)の内容をまとめさせていただいた(図3、4)。今後、本受賞を励みに、ますます、安全かつ有効なDDS医薬の開発研究に邁進したいと念じている。

第9回日本DDS学会永井賞の受賞に際し、恩師眞弓忠範先生(大阪大学名誉教授・神戸学院大学薬学研究科教授)には、ご懇篤なるご指導・ご鞭撻を終始賜りました。この場をお借りして、厚く御礼を申し上げます。また本発表は、独立行政法人医薬基盤研究所理事長の山西弘一先生、独立行政法人医薬

品医療機器総合機構顧問の早川堯夫先生、大阪大学大学院薬学研究科教授の中川晋作先生にご支援を賜り、角田慎一先生・鎌田春彦先生・阿部康弘先生・長野一也先生(医薬基盤研究所)、岡田直貴先生・吉岡靖雄先生・吉川友章先生・向 洋平先生(大阪大学)、紀平哲也先生(厚生労働省)、柴田寛子先生(国立医薬品食品衛生研究所)、杉田敏樹先生(独立行政法人医薬品医療機器総合機構)、岡本貴行先生(三重大学)、さらには多くの共同研究者の先生方、独立行政法人医薬基盤研究所創薬プロテオミクスプロジェクトの全メンバー、大阪大学大学院薬学研究科毒性学分野の学生の皆さんとの成果です(図5)。重ねて御礼を申し上げます。

なお本研究では、文部科学省科学研究費補助金特定領域研究(No.20015052)、日本学術振興会科学研究費補助金基盤研究B一般(No.21390046)、厚生労働科学研究費補助金化学物質リスク研究事業(No.H19-化学-一般-005)、厚生労働科学研究費補助金医薬品・医療機器等レギュラトリーサイエンス総合研究事業(No.H19-医薬-一般-010)、厚生労働科学研究費補助金政策創薬総合研究(HS)事業(No.KHC1017)、厚生労働科学研究費補助金創薬基盤推進研究事業：創薬バイオマーカー探索研究事業(No.H21-バイオ-指定-005)、文部科学省地域科学技術振興施策知的クラスター創成事業、環境省環境研究・技術開発推進費(地球環境研究総合推進費)、厚生労働科学研究費補助金子ども家庭総合研究事業育(H20-子ども-一般-002)、財団法人永井記念薬学国際交流財団の支援を賜りました。ここに深謝申し上げます。

最後になりましたが、種々ご高配を賜りました、

日本 DDS 学会理事長の橋田 充先生、第 25 回日本 DDS 学会学術集会会長の松村保広先生をはじめとする関係の諸先生方に心より御礼を申し上げます。

文 献

- 1) Hanash S : Disease proteomics. *Nature* 422 : 226-232, 2003.
- 2) Aderka D, Engelmann H, Maor Y, Brakebusch C, Wallach D : Stabilization of the bioactivity of tumor necrosis factor by its soluble receptors. *J Exp Med* 175 : 323-329, 1992.
- 3) Feldmann M, Maini R N : Lasker Clinical Medical Research Award. TNF defined as a therapeutic target for rheumatoid arthritis and other autoimmune diseases. *Nat Med* 9 : 1245-1250, 2003.
- 4) Muto Y, Nouri-Aria K T, Meager A, Alexander G J, Eddleston A L et al : Enhanced tumor necrosis factor and interleukin-1 in fulminant hepatic failure. *Lancet* 2 : 72-74, 1988.
- 5) Breedveld F C, Emery P, Keystone E, Patel K, Furst D E et al : Infliximab in active early rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 63 : 149-155, 2004.
- 6) Genovese M C, Bathon J M, Martin R W, Fleischmann R M, Tesser J R et al : Etanercept versus methotrexate in patients with early rheumatoid arthritis : two-year radiographic and clinical outcomes. *Arthritis Rheum* 46 : 1443-1450, 2002.
- 7) Gomez-Reino J J, Carmona L, Valverde V R, Mola E M, Montero M D : Treatment of rheumatoid arthritis with tumor necrosis factor inhibitors may predispose to significant increase in tuberculosis risk : a multicenter active-surveillance report. *Arthritis Rheum* 48 : 2122-2127, 2003.
- 8) Lubel J S, Testro A G, Angus P W : Hepatitis B virus reactivation following immunosuppressive therapy : guidelines for prevention and management. *Intern Med J* 37 : 705-712, 2007.
- 9) Sicotte N L, Voskuhl R R : Onset of multiple sclerosis associated with anti-TNF therapy. *Neurology* 57 : 1885-1888, 2001.
- 10) Mori L, Iselin S, De Libero G, Lesslauer W : Attenuation of collagen-induced arthritis in 55-kDa TNF receptor type 1 (TNFR1)-IgG1-treated and TNFR1-deficient mice. *J Immunol* 157 : 3178-3182, 1996.
- 11) Kassiotis G, Kollias G : Uncoupling the proinflammatory from the immunosuppressive properties of tumor necrosis factor (TNF) at the p55 TNF receptor level : implications for pathogenesis and therapy of autoimmune demyelination. *J Exp Med* 193 : 427-434, 2001.
- 12) Liu J, Marino M W, Wong C, Grail D, Dunn A, et al : TNF is a potent anti-inflammatory cytokine in

autoimmune-mediated demyelination. *Nat Med* 4 : 78-83, 1998.

参考文献

本稿の内容は、下記の論文等に詳細を報告している。

- Kamada H, Tsutsumi Y, Sato-Kamada K, Yamamoto Y, Yoshioka Y et al : Synthesis of a poly(vinylpyrrolidone-co-dimethyl maleic anhydride) co-polymer and its application as renal targeting carrier. *Nat Biotechnol* 21 : 399-404, 2003.
- Yamamoto Y, Tsutsumi Y, Yoshioka Y, Nishibata T, Kobayashi K et al : Site-specific PEGylation of a lysine-deficient TNF-alpha with full bioactivity. *Nat Biotechnol* 21 : 546-552, 2003.
- Kaneda Y, Tsutsumi Y, Yoshioka Y, Kamada H, Yamamoto Y et al : The use of PVP as a polymeric carrier to improve the plasma half-life of drugs. *Biomaterials* 25 (16) : 3259-3266, 2004.
- Kodaira H, Tsutsumi Y, Yoshioka Y, Kamada H, Kaneda Y et al : The targeting of anionized polyvinylpyrrolidone to the renal system. *Biomaterials* 25 : 4309-4315, 2004.
- Kamada H, Tsutsumi Y, Yoshioka Y, Yamamoto Y, Kodaira H et al : Design of a pH-sensitive polymeric carrier for drug release and its application in cancer therapy. *Clin Cancer Res* 10(7) : 2545-2550, 2004.
- Shibata H, Yoshioka Y, Ikemizu S, Kobayashi K, Yamamoto Y et al : Functionalization of TNF-alpha using phage display technique and PEGylation improves its antitumor therapeutic window. *Clin Cancer Res* 10 (24) : 8293-8300, 2004.
- Shibata H, Yoshioka Y, Ohkawa A, Minowa K, Mukai Y et al : 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.
- Yoshikawa T, Sugita T, Mukai Y, Yamamoto N, Nagano K et al : 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.
- Mukai Y, Shibata H, Nakamura T, Yoshioka Y, Abe Y et al : 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*, in press.
- Yoshikawa T, Sugita T, Mukai Y, Yamamoto N, Nagano K et al : The augmentation of intracellular delivery of peptide therapeutics by artificial protein transduction domains. *Biomaterials*, in press.
- Kayamuro H, Yoshioka Y, Katayama K, Hiroi T, Nomura T et al : Mutant TNF-alpha as mucosal vaccine adjuvants enhance antigen specific IgA immune responses in mice. *Biomaterials*, in press.

改良型アデノウイルスベクター 開発の最前線

みずぐちひろゆき
水口裕之^{1,2)}

¹⁾大阪大学大学院薬学研究科 分子生物学分野
²⁾独立行政法人 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
E-mail: mizuguch@phs.osaka-u.ac.jp

Summary

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中心に解説する。遺伝子導入技術の開発は、遺伝子治療への応用だけでなく、遺伝子機能解析等を目的とした基礎研究のための必須の基盤技術となっており、改良型アデノ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。なお本稿では、あえて脳科学、神経科学に限局しないで、改良型アデノウイルスベクターの特徴を広く紹介することに主眼をおかせて頂いた。また、アデノウイルスベクター作製に関する技術面での解説は、本誌2009年4月号で行う予定である。

I. アデノウイルスの性質

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、アデノウイルスベクターは、主にヒト5型アデノウイルスを基盤としている。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。

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。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)；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。

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。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）を外來遺伝子に置き換え、E1タンパク質を恒常的に発現している293細胞等で増殖させる。従って、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。

II. 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、②導入遺伝子が宿主染色体への組み込み活性をもたず、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されれば、数ヵ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、等のベクターとしての優れた基本的性質を有している。

一方、①CAR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、④従来のパッケージング細胞である293細胞を用いた場合、低頻度ながら293細胞に組み込まれたE1遺伝子との間で相同組換えが起こり自己

増殖可能なアデノウイルス（replication competent adenovirus: RCA）が出現する可能性がある等の問題点を有し、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盛んに行われている。

III. 増殖性ウイルスの出現を抑えた非増殖型アデノウイルスベクター作製システムの開発

現在汎用されているE1欠損型アデノウイルスベクターは、アデノウイルスゲノムの342-3523 bpを欠損しているものが多く、この部分に外来遺伝子（治療用遺伝子）に挿入している。一方、パッケージング細胞である293細胞の染色体にはアデノウイルス・E1遺伝子を含む1-4344 bpがインテグレートされており、アデノウイルスベクターゲノムとの間にE1領域の前後で相同な遺伝子配列（1-342 bpおよび3523-4344 bp）が存在するため、相同組換えによりRCAが出現する（図1）。RCAは通常の細胞に感染した場合、増殖し細胞融解を引き起こすことから、副作用を引き起こす危

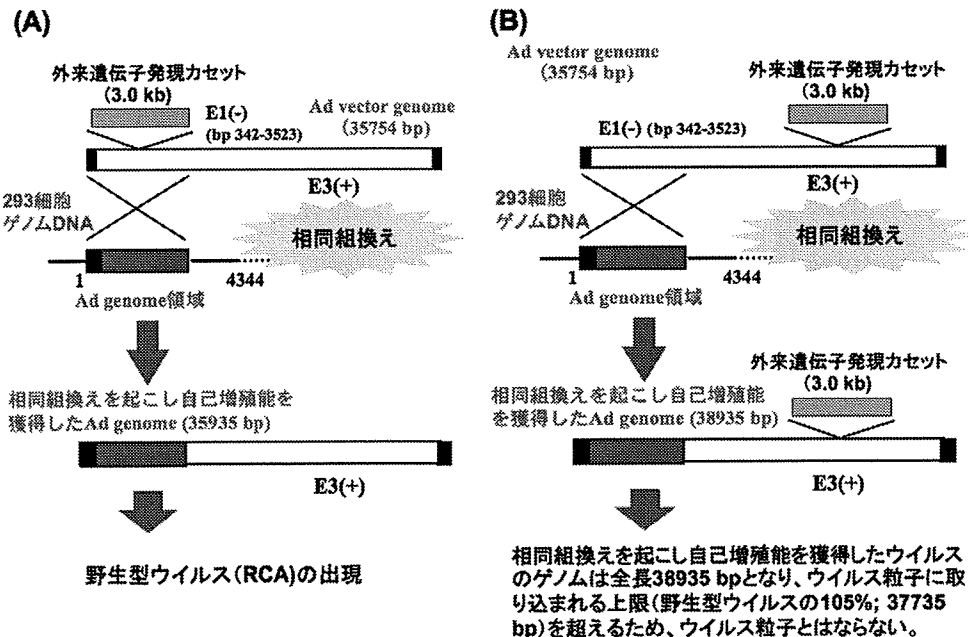


図1 パッケージングリミットを利用したRCA出現回避法の開発

E1欠損領域に外来遺伝子を挿入した従来のアデノウイルスベクター(A)では293細胞にインテグレートされているE1遺伝子との相同組換えによりRCAが出現するが、新しく開発したE1欠損領域以外の部位（ここではE3領域に挿入）に外来遺伝子を挿入したアデノウイルスベクター(B)では、ゲノムサイズを調整することで、E1陽性となったアデノウイルスゲノムはパッケージングリミットを超え、ウイルス粒子とならない。

険性がある。現在、米国FDA (Food and Drug Administration) は遺伝子治療臨床研究で用いるアデノウイルスベクターに含まれるRCAの混入許容値として 3×10^{10} particle titerあたりRCA 1 infectious titer未満を推奨している。従って、遺伝子治療用のアデノウイルスベクターを調製する際には、RCAの出現・混入を出来る限り抑える必要がある。RCAが理論上出現しない293細胞以外のパッケージング細胞がいくつか報告されているが¹⁾、(使用料が高価であり)一般には普及していない。著者らは最近、アデノウイルスベクターのゲノム配列を改変することで、たとえE1領域で相同組換えを起こしても、アデノウイルスベクターゲノムがパッケージングリミットを超えるように(すなわち、ウイルス粒子とならないように)ベクターを設計することで、RCAの出現を劇的に抑制できるベクター系を開発した(詳細は図1を参照)。本アデノウイルスベクター系を用いれば、RCAの出現頻度が激減するため、安全性の向上やアデノウイルスベクターを製造していく上でのコストの点で、大きな貢献が期待できる。さらに、基礎研究分野でのアデノウイルスベクターの使用に関しても、確実にRCA混入

率が低いベクターストックを調製可能であることから、研究の効率が格段に上がることが予想される。

IV. 標的細胞指向性の制御

1. 遺伝子導入時のCAR依存性を克服したアデノウイルスベクターの開発

前述のようにヒト5型アデノウイルスはCARを受容体として細胞に感染するが、CARの発現が乏しいために従来のアデノウイルスベクターでの効率の良い遺伝子導入が困難な細胞種は意外と多い。例えば、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、骨格筋細胞、滑膜細胞等が知られている。また、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の低下が報告されており²⁾、本ベクターを用いて癌を対象とした遺伝子治療臨床研究を進める上で考慮すべき問題と考えられている。

アデノウイルスベクターによる遺伝子導入時のCAR依存性を克服するために、ファイバータンパク質を改変した改良型ベクターの開発が進んでいる。例

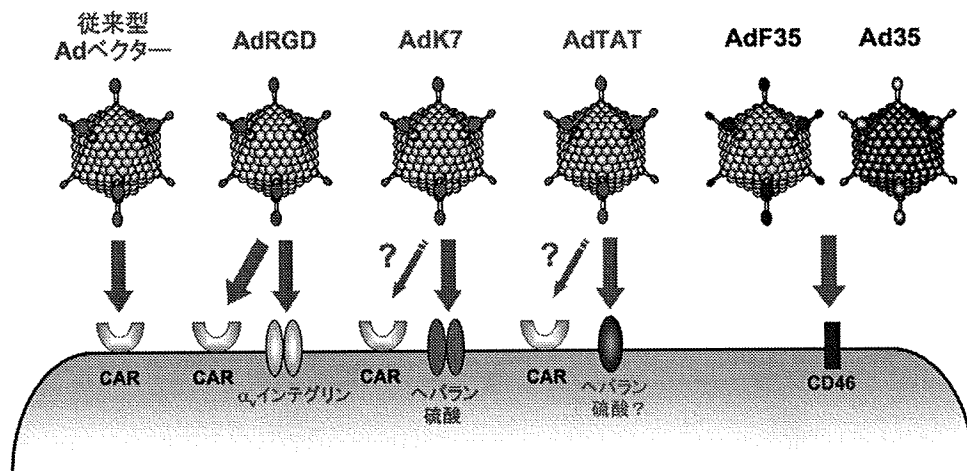


図2 感染域の制御が可能な各種改良型アデノウイルスベクター

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CARを受容体として感染するが、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、35型のアデノウイルスのファイバーを有したベクター(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。

例えば、 α_v インテグリンに親和性があるRGD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：蛋白質導入ドメイン) として知られているTATペプチドをファイバー表面上に遺伝子工学的に表現させることにより、CARを発現していない細胞に対しても効率良く遺伝子導入できる³⁻⁵⁾(図2)。また、ファイバー部位をCAR以外の分子を認識する他の血清型のアデノウイルスのファイバーに置換することでも遺伝子導入時のCAR依存性を克服することが出来る。例えば、ヒト由来細胞であればほとんど全ての細胞に発現が認められるCD46を受容体としている11・35型アデノウイルス由来のファイバーを付与することで⁶⁾、5型アデノウイルスベクターでの効率の良い遺伝子導入が困難な造血幹細胞、樹状細胞等への効率の良い遺伝子導入が可能になる。

2. 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

ターゲティング能を有したベクターの開発は、全身

投与での治療効果が期待できるだけでなく、例えば局所にベクターを投与した場合においても、標的細胞以外への感染、拡散を防ぐことが期待できることから、有効性の向上や副作用の抑制につながる。目的の組織でだけ遺伝子を発現させることが可能なアデノウイルスベクターの開発には、①カプシドタンパク質の遺伝子工学的な改変、②抗体やタンパク質、高分子を用いてのベクター表面の修飾、あるいは③組織特異的プロモーターの利用等の方法がある⁷⁾。最終的には、これらの組み合わせが好ましいが、ベクター自身を改変する①が最も基本的で重要な基盤技術になると考えられ、精力的に研究が進められている。

アデノウイルスの*in vivo*への感染は、ファイバーとCARとの結合だけでなく、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重要な役割を果たす⁷⁾。さらに、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

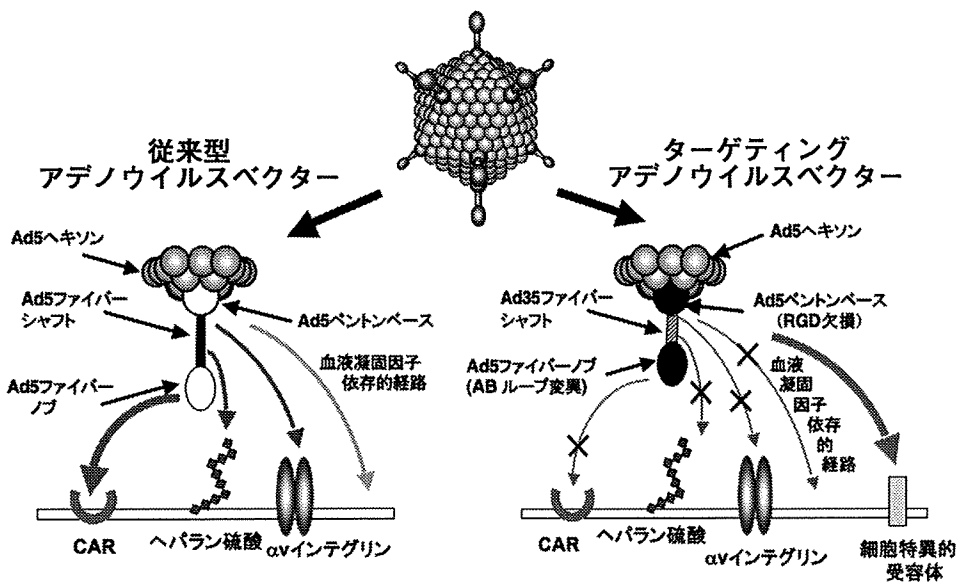


図3 ターゲティング能を有したアデノウイルスベクター

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 α_v 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、さらには④血液凝固因子を介した感染ルートを回避したベクターを開発する必要がある。次に、このベクターに標的細胞特異的に結合するリガンド等を付与することで、ターゲティング能を有したアデノウイルスベクターが開発できる。