

## 次世代遺伝子治療薬の開発基盤研究

水口 裕之

## Basic Study for Next-generation Gene Therapy Products

Hiroyuki MIZUGUCHI

National Institute of Health Sciences, 1-18-1 Kamiyoga, Setagaya-ku, Tokyo 158-8501, Japan

(Received June 2, 2003)

Successful gene therapy depends largely on vectors that can efficiently deliver the therapeutic genes into the target tissues and cells. Recombinant adenovirus (Ad) vectors continue to be the preferred vectors for gene therapy because they can easily be grown to high titers and can efficiently transfer genes into both dividing and nondividing cells. However, there are some limitations such as the time-consuming and labor-intensive procedures for vector construction, coxsackievirus-adenovirus receptor (CAR)-dependent gene transfer, immunologic side effects, lack of tissue specificity, lack of regulation of gene expression, etc. In this paper, I review our approach to the development of advanced recombinant Ad vectors. The next generation of Ad vectors have not only become promising vectors for gene therapy but also important tools for gene transfer into mammalian cells.

**Key words**—adenovirus vector; gene therapy; gene transfer; gene functional analysis

## 1. はじめに

1990年、米国において初めて臨床研究が行われた遺伝子治療は、現在では世界で3000名を超える患者に施行されている。この中で、治療効果が認められたプロトコルも散見されるが、必ずしも満足すべき結果は得られていない。その最大の原因は、遺伝子導入技術の根幹をなすベクターが必要とする要件を十分備えていないことにある。したがって、今後の遺伝子治療の実用化と一層の進展に向けての最重要課題の1つは、従来のベクターが抱える安全性面、機能面での問題点を克服した新規ベクターを開発することである。そこで著者らは、既存のベクターでは最も遺伝子導入効率が優れているアデノウイルスベクターの長所を活かしつつ、問題点を克服し、新たな機能を付与した次世代アデノウイルスベクターの開発研究を進めている。

## 2. アデノウイルスの性質と構造

アデノウイルスには、現在までにヒト・チンパン

ジー・ウシ・ヒツジ・イヌ・ブタ・マウス・トリなどを宿主とする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。

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。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、<sup>1)</sup>その後ペントンベースのRGD (Arg-Gly-Asp)モチーフと細胞表面上のインテグリン ( $\alpha v\beta 3$ ,  $\alpha v\beta 5$ )との相互作用でインターナリゼーションを受けることによって起こる。<sup>2)</sup>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蛋白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

国立医薬品食品衛生研究所 遺伝子細胞医薬部 (〒158-8501 世田谷区上用賀 1-18-1)

e-mail: mizuguch@nihs.go.jp

\*本総説は、平成15年度日本薬学会奨励賞の受賞を記念して記述したものである。

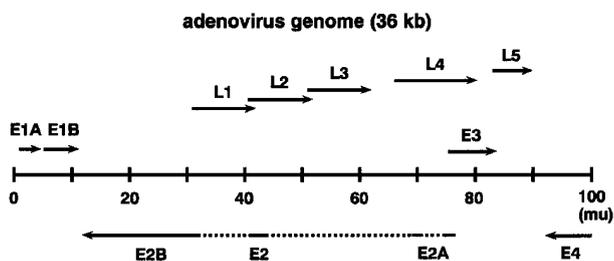


Fig. 1. Adenovirus Genome  
Viral DNA is expressed as map units (mu).

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。<sup>3,4)</sup> 核内に導入されたウイルスゲノムは、ゲノム両末端の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蛋白質前駆体 (pre-terminal protein)、宿主由来の蛋白質など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2本鎖DNAをゲノムとして持ち、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 (Fig. 1)。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蛋白質の合成に関与する。遺伝子治療の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蛋白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によりすべ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蛋白質をトランスに供給できる細胞株である293細胞などで増殖させる。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 (Fig. 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105%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及び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<sup>5,6)</sup> (ファイバー改変型ベクターでは最大約8.9 kbまでの外来遺伝子を挿入できる<sup>7)</sup>。

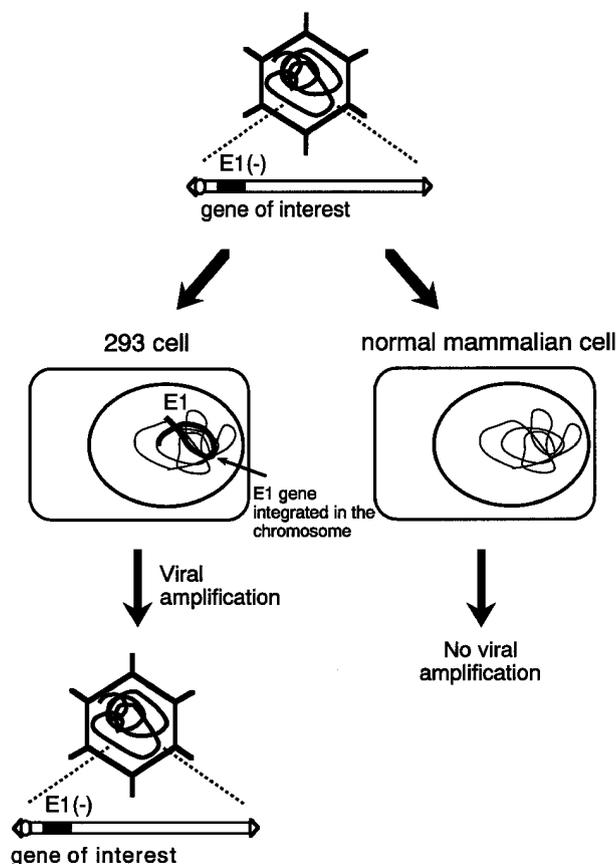


Fig. 2. Mechanism of Recombinant Adenovirus Vector

### 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以下に示すような特徴を有している。1)種を問わず多くの種類の細胞に遺伝子導入でき、現存するベクターの中では最も遺伝子導入効率の良いものの1つである。2)増殖停止期の細胞に対しても効率良く遺伝子導入できる。3) *in vivo* への直接の遺伝子導入にも適している。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 (レトロ・レンチ・アデノ随伴ウイルスベクターなどに比べ1000倍以上の収量が得られる)。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,<sup>5,6)</sup> ファイバー改変型で最大約8.9 kbまで<sup>7)</sup>)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。

一方欠点としては、血球系の細胞などアデノウイ

ルス受容体の 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あげられる。著者らは上記のような長所を活かしつつ欠点を克服し、新たな機能を付与した次世代アデノウイルスベクターの開発を進めており、以下に解説する。

#### 4. 簡便なアデノウイルスベクター作製法の開発

従来、アデノウイルスベクター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作製していた。これは、アデノウイルスが約 36 kb と大きなゲノムを有しているため、利用可能なユニークな制限酵素部位が少なく、*in vitro* ライゲーションでの外来遺伝子のウイルスゲノムへの挿入が困難であるためであった。しかしながら相同組換えを利用した方法は、動物細胞内での相同組換えの効率が良くないため非効率的であること、煩雑な作業を必要とすること、など多くの問題点を抱えていた。著者らは、9—11 bp 以上を認識する制限酵素である I-CeuI と PI-SceI (共にアデノウイルスゲノムは切断しない) を利用することでこの問題点を解決し、

ウイルスゲノムの E1 欠損領域への外来遺伝子の挿入を *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て行うことによる簡便なアデノウイルスベクター作製法を開発した。<sup>6,8,9)</sup>

ベクタープラスミドは、E1 (/E3 or /E3/E4) 領域を除くすべてのアデノウイルスゲノムを有しており、E1 欠損部位に 3 つの制限酵素ユニーク部位の I-CeuI, SwaI, PI-SceI 部位を有している (Fig. 3)。アデノウイルスベクターを作製する場合には、I-CeuI と PI-SceI 部位を有したシャトルプラスミド (カナマイシン耐性遺伝子を有している) に目的遺伝子を挿入し、I-CeuI と PI-SceI 部位を利用してベクタープラスミドの E1 欠損領域に目的遺伝子を挿入する。この際、ベクター・シャトル両プラスミドとも I-CeuI と PI-SceI での切断後の電気泳動などによる目的 DNA 断片の回収は一切不要であり、直接両者をライゲーションできる。すなわち、ライゲーション産物を SwaI (8 塩基認識酵素のため目的遺伝子を切断する可能性は低い) で処理することにより、大腸菌へのトランスフォーメーション後の親のベクタープラスミドの出現が抑えられること、

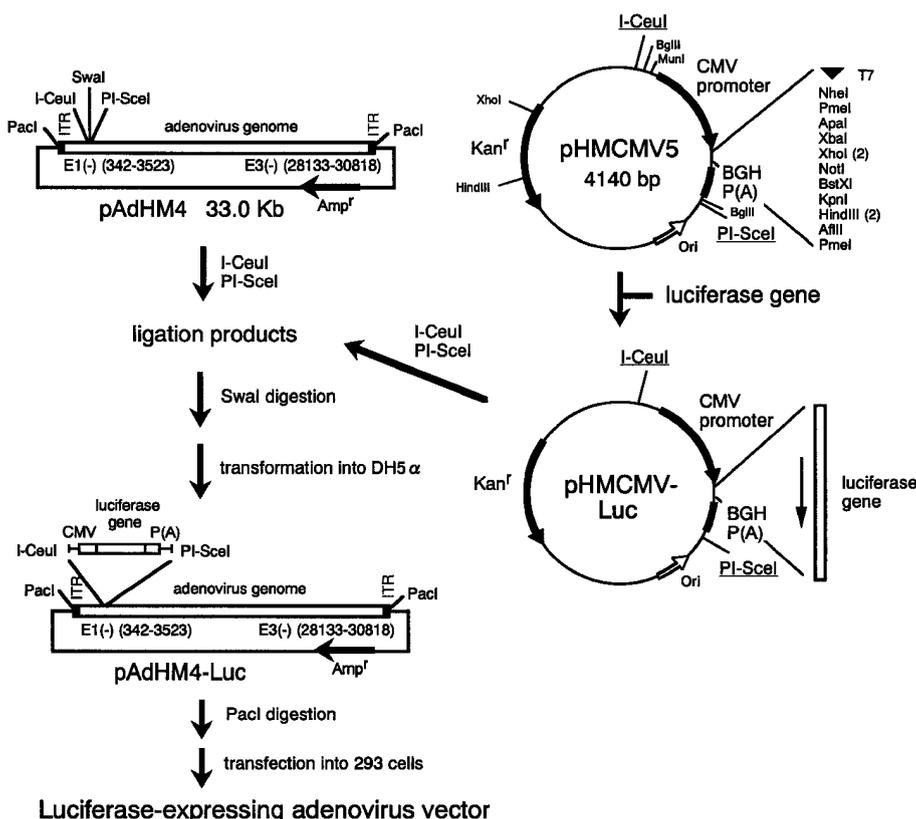


Fig. 3. Construction of Luciferase-Expressing Adenovirus Vectors by an Improved *in vitro* Ligation Method

またシャトルプラスミドの出現は薬剤耐性の違い（目的の組換えプラスミドはアンピシリン耐性遺伝子を有しているが、シャトルプラスミドはカナマイシン耐性遺伝子を有している）を利用することで抑えられるように工夫されており、目的の組換えプラスミドを最小限の労力で効率良く選択できるようになっている。生じたプラスミドをゲノム両末端に存在する制限酵素部位 PacI（8塩基認識酵素のため目的遺伝子を切断する可能性は低い）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が生じる（Fig. 3）。

本法は、1)簡便なプラスミド構築に基づいているため、特別な試薬・技術を必要とせず、簡単にウイルスDNA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良く、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、プラーク精製などを通じ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。既に、本システムは市販化（クロンテック社）されており、国内外の多くの研究者に利用されている。

##### 5. 遺伝子発現に関わる配列の最適化による高効率遺伝子発現アデノウイルスベクター

アデノウイルスベクターは既存のベクターの中で

は最も遺伝子発現効率に優れたベクターであるが、遺伝子発現に関わる配列、すなわちプロモーター・エンハンサー・イントロン・P(A)配列などを最適化することで、さらに遺伝子発現能を高めることが可能である。著者らは、CMVプロモーター/CMVエンハンサー/イントロンA/WPRE (Woodchuck hepatitis virus posttranscriptional regulation element)/BGH (bovine growth hormone) P(A)を基本発現単位とするアデノウイルスベクターが、従来広く用いられており強力な発現を示すことが知られているCMVプロモーター/CMVエンハンサー/BGH P(A)を用いたベクター（現在の遺伝子治療臨床研究で用いられているアデノウイルスベクターの多くが、CMVプロモーター/CMVエンハンサー/BGH P(A)と同等の発現単位を有している）に比べ、*in vitro*で10—50倍以上、*in vivo*（マウス）では100—700倍以上高い遺伝子発現を示すことを明らかにしている（Fig. 4）<sup>10,11</sup>。イントロンAとWPRE配列は、mRNAのP(A)化の修飾、mRNAの核外輸送や翻訳の促進作用を有しており、これらの働きにより、特に*in vivo*では劇的な遺伝子発現の上昇が可能となった。単位ベクターあたりの遺伝子発現能を高めたベクターは、有効性の上昇だけでなく投与量の減少による副作用の軽減も期待できることから、今後の応用が期待される。

##### 6. 感染域を拡大させたアデノウイルスベクター

アデノウイルスベクターの感染域は非常に広く、

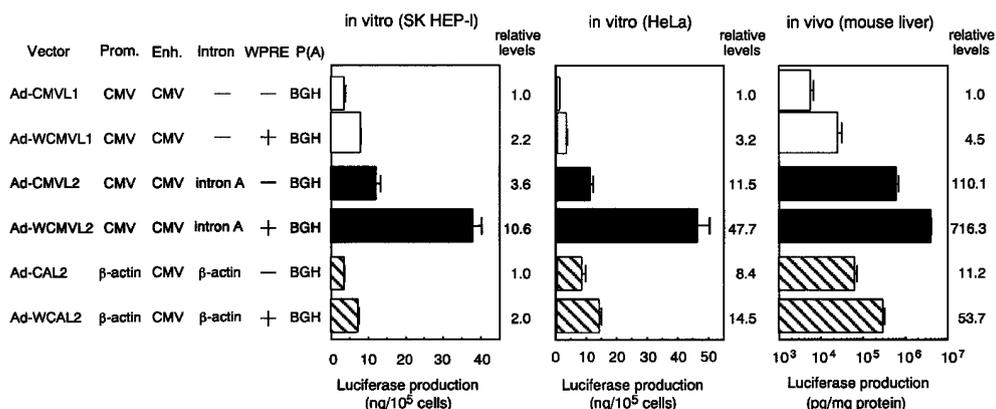


Fig. 4. Development of Adenovirus Vectors with Highly Efficient Expression by Optimizing *cis*-Regulatory Elements

SK HEP-1 and HeLa cells were transduced with various adenovirus vectors at MOI of 10 for 1.5 h. After culture for 48 h, luciferase production was measured by a luminescent assay. All data represent the mean  $\pm$  S.D. of four experiments. *In vivo* experiment, the adenovirus vectors ( $1 \times 10^9$  PFU) were intravenously injected into the mice. Forty-eight hours later, the heart, lung, kidney, spleen and liver were isolated and luciferase production was measured by luminescent assay. All data represent the mean  $\pm$  S.E. of five mice. The relative expression levels were described by designating the value of Ad-CMV1 as 1.0. WPRE: Woodchuck hepatitis virus posttranscriptional regulation element, BGH: bovine growth hormone.

多くの細胞に遺伝子導入が可能であるが、遺伝子治療の重要なターゲットである細胞・組織の一部において、CARの発現が乏しく、本ベクターが十分な機能を発揮できない場合が知られている。例えば、造血幹細胞を始めとする血液細胞、樹状細胞、気道上皮細胞、平滑筋細胞、血管内皮細胞、骨格筋細胞、一部の癌細胞、多くのマウス由来株化細胞などはCARの発現が乏しく、アデノウイルスベクターによる遺伝子導入効率は低い。ウイルス表面上のファイバーを改変したベクターは、アデノウイルスベクターによる遺伝子導入時のCAR依存性を克服することが期待できる。

ファイバー遺伝子はウイルス後期遺伝子のL5領域に位置し、その構造はテール、シャフト、ノブの領域に分けられる。CARと結合するのはC末端のノブ領域である。著者らは、外来ペプチドの挿入部位として適したファイバーのHIループやC末端コード領域にユニークな制限酵素部位を挿入することで、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を利用して外来ペプチドコード遺伝子をファイバー当該領域に挿入できるベクターシステムを開発した (Figs. 5, 6).<sup>12,13)</sup> モデルとして $\alpha$ vインテグリンに親和性のあるArg-Gly-Asp (RGD) 配列や、ヘパラン硫酸に親和性のあるポリリジン配列をファイバーに付与したアデノウイルスベクター (Ad-RGD, Ad-K7 など) を作製し、メラノーマや樹状細胞などのCAR陰性細胞に対して10–1000倍の遺伝子導入活性を示すことを明らかにした (Fig. 7).<sup>12–16)</sup> さらに、自殺遺伝子 (herpes simplex virus thymidine kinase) やサイトカイン・

ケモカイン遺伝子 (tumor necrosis factor- $\alpha$ , interleukin-12, interleukin-11 receptor $\alpha$ -locus chemokine) を発現するAd-RGDを、CAR陰性のマウスメラノーマ担癌マウスの腫瘍内に投与したところ、従来型アデノウイルスベクターを用いた場合の約10–25倍の抗腫瘍効果の増大が認められ、一方で肝臓へのベクターの漏れは1/8に減少 (肝障害が減弱) し、癌遺伝子治療における有用性を実証した。<sup>17–21)</sup> Ad-RGDはCARを介しても感染できるためCAR陽性細胞に対しても従来のアデノウイルスベクターと同等以上の遺伝子導入効率を有すること、癌の悪性度とともにCARの発現レベルは低下する傾向にあること、<sup>22,23)</sup> 多くの癌細胞 (特に固形癌) は $\alpha$ vインテグリン陽性であることを考え合わせると、癌への遺伝子治療において優れたベクターになると考えられる。

#### 7. ターゲティング能を有したアデノウイルスベクター

前項では感染域を拡大させたベクターについて述べたが、ターゲティングという観点からは、感染域を狭め、特定の組織にのみ遺伝子導入できるベクターの開発が重要である。ターゲティング能を有したベクターは、全身投与で有効性が期待できる将来の遺伝子治療のための基盤技術になるばかりでなく、局所にベクターを投与するプロトコールにおいても投与部位の標的組織への親和性を高め、標的組織から漏れたベクターが他臓器に移行することによって起こる副作用の回避も期待できるなど、有効性や安全性の向上に不可欠の技術である。目的の組織でだけ遺伝子を発現させるアデノウイルスベクター

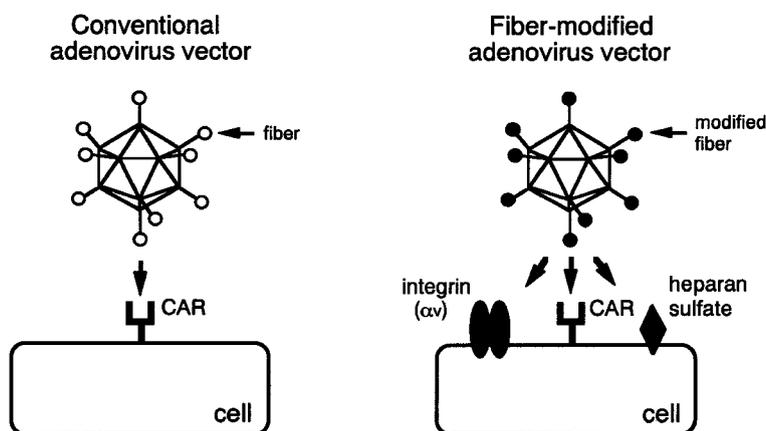


Fig. 5. Characteristics of Gene Delivery by Various Fiber-Modified Adenovirus Vectors

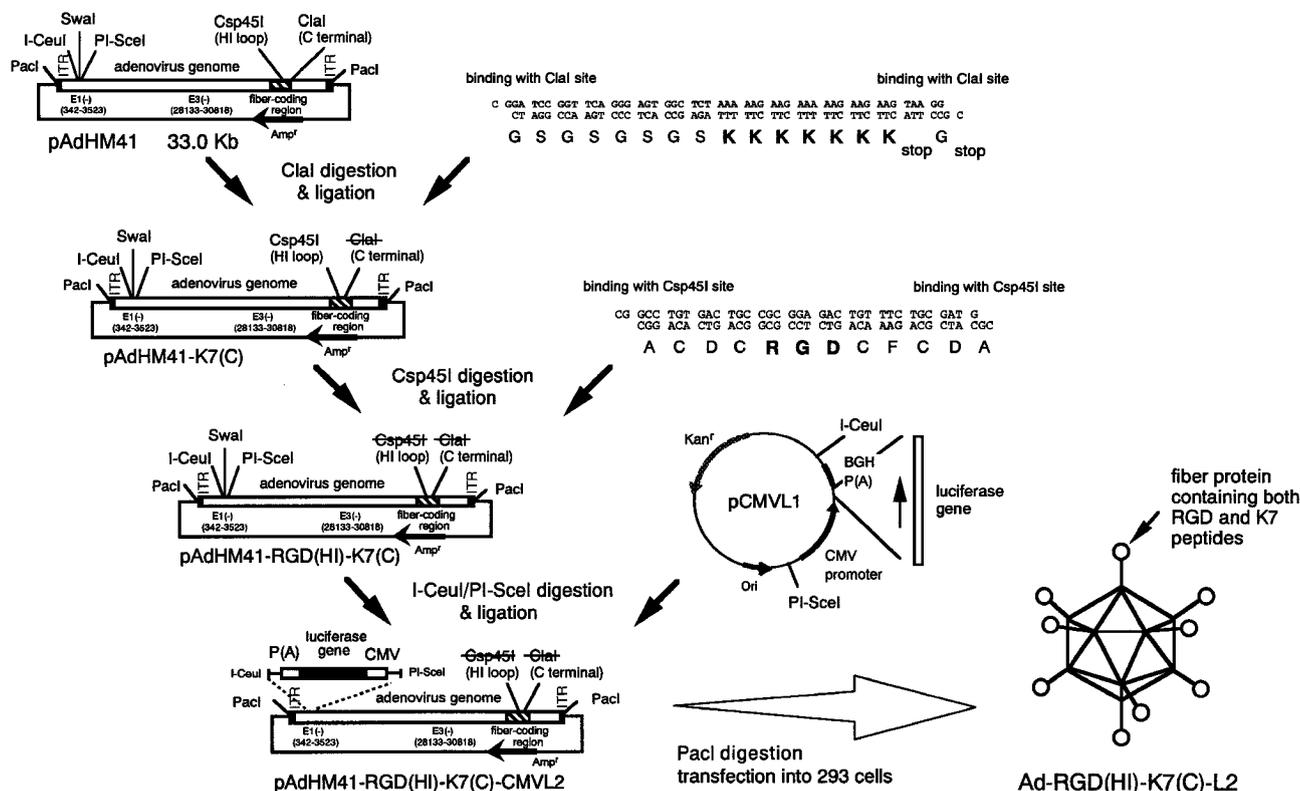


Fig. 6. Construction of Luciferase-Expressing Adenovirus Vectors Containing both RGD and K7 Peptides in the Fiber Knob by an Improved *in vitro* Ligation Method

First, pAdHM41 was digested by ClaI, and ligated with the oligonucleotides, which contains a binding site with ClaI-digested fragment and corresponds to the flexible linker ((GS)4) and K7 (KKKKKKK) peptide, resulting in pAdHM41-K7 (C). The oligonucleotides were designed such that the positive recombinant plasmid lacks a ClaI site for convenience of selection (generation of self-ligated parental plasmid was reduced by the digestion of ligation sample with ClaI). Second, pAdHM41-K7 (C) was digested with Csp45I and ligated with oligonucleotides, which contains a binding site with Csp45I-digested fragment and corresponds to the RGD peptide. The oligonucleotides were designed such that the positive recombinant plasmid lacks a Csp45I site for convenience of selection, resulting in pAdHM41-RGD (HI)-K7 (C). Finally, pAdHM41-RGD (HI)-K7 (C)-L2 was constructed by the ligation of I-CeuI/PI-SceI-digested pAdHM41-RGD (HI)-K7 (C) with I-CeuI/PI-SceI-digested pCMV1. Luciferase-expressing adenovirus vectors containing RGD and K7 peptide in the HI loop or C terminal of the fiber knob, respectively, (Ad-RGD (HI)-K7 (C)-L2) were produced by transfection of the PacI-digested pAdHM41-RGD (HI)-K7 (C)-L2 into 293 cells.

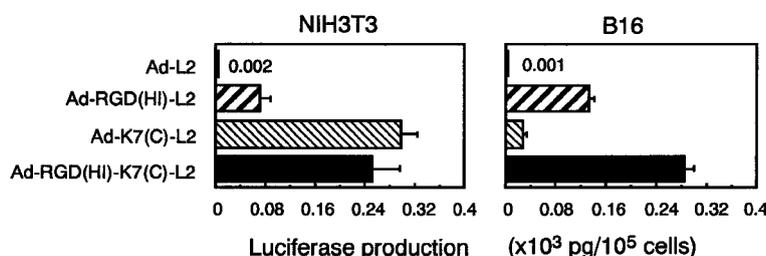


Fig. 7. Enhanced Luciferase Production in NIH3T3 and B16 Cells by Various Fiber-Modified Adenovirus Vectors

NIH3T3 and B16 cells were transduced with 300 VP (vector particles)/cell of Ad-L2, Ad-RGD (HI)-L2, Ad-K7 (C)-L2, or Ad-RGD (HI)-K7 (C)-L2 for 1.5 h. After culture for 48 h, luciferase production was measured by a luminescent assay. The data are expressed as mean  $\pm$  S.D. (n=4).

の開発には、1)カプシド蛋白質の遺伝子工学的な改変、2)抗体や蛋白質、高分子でベクター表面を修飾することによる生化学的・化学的方法、あるいは3)組織特異的プロモーターの利用などの方法がある。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る。そこで遺伝子工学的アプローチから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を行った。

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、まず native のウイルスの受容体を介しては感染しないベクターを開発し、そ

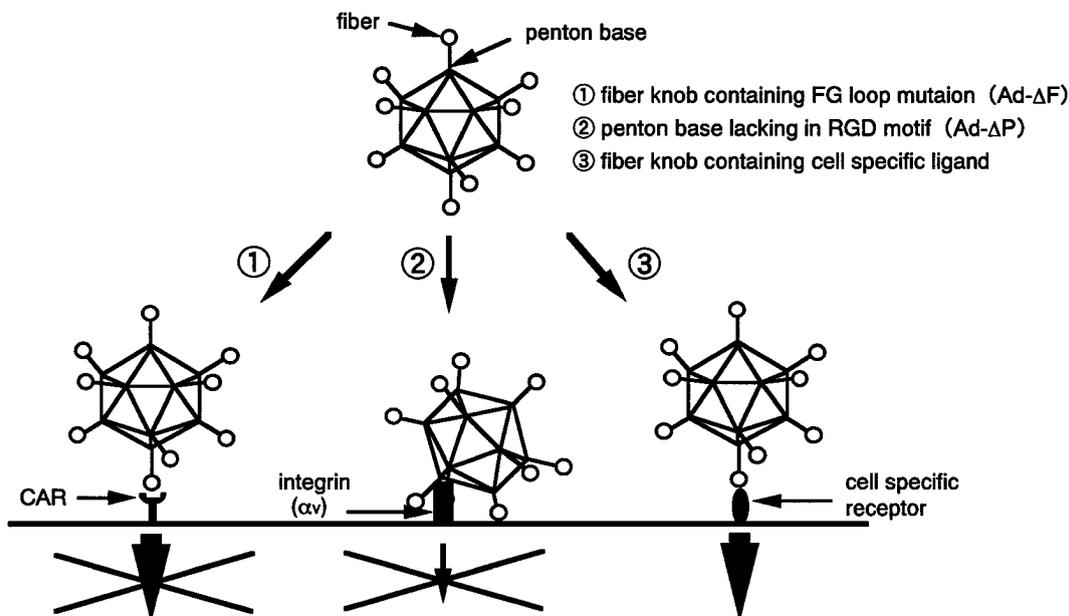


Fig. 8. Targeted Adenovirus Vectors

のベクターに細胞特異的リガンドを付与することが必要である (Fig. 8). そこで CAR を認識した感染ルートをブロックし、かつ低親和性であるがペントンベースの RGD モチーフが  $\alpha_v$  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もブロックしたベクターを開発した (Fig. 8 の①Ad-ΔF, ②Ad-ΔP に相当). CAR と結合できないベクター (Ad-ΔF) は、ファイバーノブの FG ループ領域の 4 アミノ酸を欠損させることにより作製した. この領域を欠損させるとファイバーは構造変化を起こし、CAR とは結合できないことが報告されている.<sup>24)</sup> 一方、 $\alpha_v$  インテグリンと結合できないベクター (Ad-ΔP) は、ペントンベースの RGD モチーフを欠損させることにより作製した. また、両者を同時に欠損させたベクター (Ad-ΔFΔP) や、Ad-ΔFΔP のファイバーのシャフト領域を 5 型アデノウイルス由来のものから 35 型アデノウイルス由来のものに置換したベクター (Ad-ΔFΔP-S35) も作製した. これらのベクターをマウスに全身投与したところ、Ad-ΔFΔP-S35 では肝臓での遺伝子発現量は従来型ベクターに比べ 3 万分の 1 以下に減少した<sup>25)</sup> (アデノウイルスベクターはマウスに全身投与すると 95% 以上の遺伝子発現は肝臓で認められる) (Fig. 9). Ad-ΔFΔP では肝臓での遺伝子発現量は数百分の 1 であり、Ad-ΔF や Ad-ΔP は肝臓での遺伝子発現量

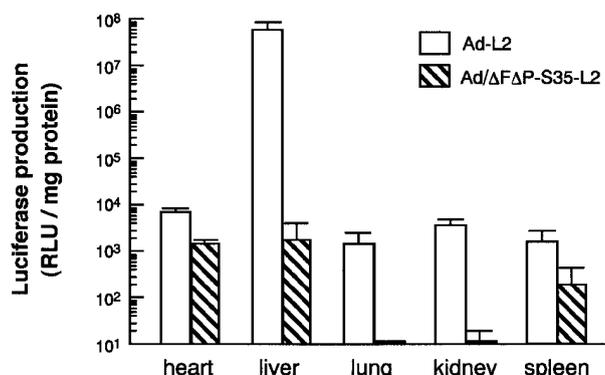


Fig. 9. Luciferase Production in Mice after the Systemic Administration of Ad-L2, Ad/ΔFΔP-L2, Ad/ΔF-S35-L2, or Ad/ΔFΔP-S35-L2

Ad-L2, Ad/ΔFΔP-L2, Ad/ΔF-S35-L2, or Ad/ΔFΔP-S35-L2 ( $3.0 \times 10^{10}$  VP) were intravenously injected into the mice. Forty-eight hours later, the heart, lung, liver, kidney, and spleen were isolated, and luciferase production was measured by luminescent assay. All data represent the mean  $\pm$  S.E. of five mice.

の有意な減少は認められなかった.<sup>26)</sup> これらの結果より、ファイバーノブ、ファイバーシャフト、ペントンベースの RGD モチーフのいずれもが、アデノウイルスベクターによる組織移行性に重要な役割を担っていることが明らかとなり、これらの領域を同時に改変することで、特定の臓器に移行する活性を持たないアデノウイルスベクターの開発に成功した. Ad-ΔFΔP-S35 のファイバーノブの HI ループや C 末端領域には、任意の外來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。

#### 8. 35型アデノウイルスベクター

ヒトアデノウイルスはAからFのsub-groupに分けられ、従来のアデノウイルスベクターはsub-group Cに属する5型（あるいは2型）アデノウイルスを基盤にしている。Sub-group Cに属するアデノウイルスをはじめ、多くのアデノウイルスはCARを認識して感染するが（例外も存在する）、sub-group Bに属するアデノウイルスはCAR以外の分子を認識して感染する（受容体は未だ未同定）。また、従来の5型アデノウイルスベクターの場合には、成人のほとんどが5型アデノウイルスに対する抗体を有していることや、複数回目のベクターの投与が、初回のベクター投与により生じた抗体により阻害されることが問題となっている。このような問題を回避し、かつ感染域を変更させ従来のアデノウイルスベクターでは遺伝子導入が困難であった細胞・組織へも効率良く遺伝子導入できるベクターの開発を目的に、著者らはsub-group Bに属する35型アデノウイルスを基本骨格としたベクターの開発

を行った。<sup>27,28)</sup>

本ベクターの機能を検討したところ、35型ベクターはヒト由来細胞においては5型ベクターより広い感染域を示した。逆にマウスを用いた *in vivo* 実験の結果では、5型ベクターの方が35型ベクターより広い感染域を示した。<sup>28)</sup> 本結果は、35型アデノウイルスの受容体が5型アデノウイルスの受容体のCARに比べ、ヒト細胞ではより広く、逆にマウス細胞ではより限られた細胞にしか発現していないことを示している。また、興味深いことに、遺伝子治療や再生医療分野で重要なターゲット組織のヒト造血幹細胞では、5型ベクターでの遺伝子導入効率は低いが、35型ベクターは極めて効率良く遺伝子導入可能であり、造血幹細胞への遺伝子導入に有用なベクターになると期待される (Fig. 10).<sup>27)</sup>

#### 9. 発現制御型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ではE1欠損領域の1ヵ所にしか外来遺伝子を挿入できなかったが、著者らはE1欠損領域に加え、E3欠損領域、並びにE4遺伝子と3'ITRの間の領域にも同時に外来遺伝子を挿入することが可能なダブル・トリプル遺伝子発現系を搭載したアデノウイルスベクターを開発した。<sup>29-31)</sup> これにより、複数の外来遺伝子を単一のベクターに搭載することが可能となり、複数のベ

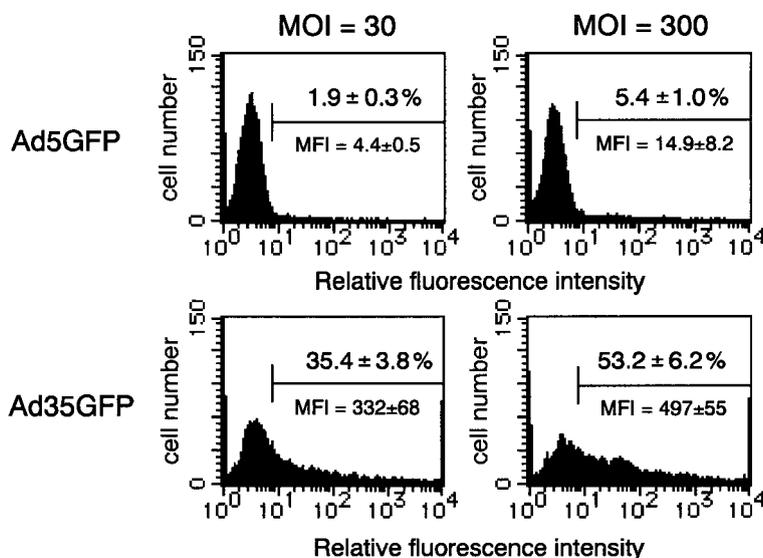


Fig. 10. GFP Expression in Human CD34<sup>+</sup> Cells Transduced with Ad5GFP or Ad35GFP

Human CD34<sup>+</sup> cells were suspended in the medium containing the cytokine cocktail ( $3 \times 10^5$  cells/ml). The cells were seeded into a 24-well plate ( $1 \times 10^5$  cells/well), and equal volumes of the adenovirus vectors were applied to the cells 16–18 h after seeding. The medium containing the cytokine cocktail was added 1.5 h after transduction. The cells were incubated without removal of adenovirus vectors and washing. Forty-eight hour later, GFP expression in the cells were measured by flow cytometry. Percentages of GFP-positive cells and means of fluorescence intensity (MFI) were shown.

クターの共投与の場合と異なり、作用させるベクター量も最小限で済ませることができるようになった。なお、これらの改変ベクターについても、*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て極めて簡便にベクターが作製できるようになっている。

ダブル・トリプル遺伝子発現系を搭載したアデノウイルスベクターの応用例として、テトラサイクリン耐性オペロンを利用した遺伝子発現制御系を単一のベクターに搭載させたシステムが考えられる。<sup>32-34)</sup> すなわち、発現制御に必要なコンポーネントを E1/E3 両欠損領域や E4 領域と 3'ITR の間の領域に挿入することにより、単一のベクターで目的遺伝子の発現制御が可能となるベクターシステムが開発できる。例えば、転写活性化因子の tTA (tetra-cycline-responsive transcriptional activator) の発現単位を E3 欠損領域に、テトラサイクリン制御性プロモーター下に目的遺伝子を発現する単位を E1 欠損領域に挿入することで作製した tet-off 系のアデノウイルスベクターは、作用させたドキシサイクリン (テトラサイクリンの誘導体) の濃度に依存した優れた目的遺伝子の発現制御能を示す (Fig. 11)。<sup>30)</sup> また、tet-on 系を搭載したアデノウイルスベクターの場合には、転写活性化因子の rtTA (reverse tetracycline-responsive transcriptional activator) 発現単位を E3 欠損領域に、転写抑制因子の tTS (tetracycline-controlled transcriptional silencer) 発現単位を E4 領域と 3'ITR の間の領域に、目的遺伝

子発現単位を E1 欠損領域に挿入することで発現制御能に優れたベクターシステムができる (Fig. 11)。<sup>31)</sup> なお、tTS 発現単位を含まない tet-off 系のベクターでは発現制御能は低いものであった。これは rtTA のテトラサイクリン制御性プロモーターへの親和性が低いこと、tTS との combination として用いることでその欠点が補われるためであると考えられる。このような発現制御型アデノウイルスベクターを用いることで、遺伝子治療における安全性が確保されるだけでなく、用量反応に伴う遺伝子の機能解析も可能となった。

ダブル・トリプル遺伝子発現系を搭載したアデノウイルスベクターの他の応用例としては、E3 欠損領域に GFP (green fluorescence protein) 発現単位を挿入し、E1 欠損領域に目的遺伝子発現単位を挿入することで、遺伝子導入された細胞を GFP で視覚的に同定しながら目的遺伝子の機能を検討する実験系への利用などが考えられる。

## 10. おわりに

従来の遺伝子治療や遺伝子導入による実験系は、多くの場合、目的 (治療用) 遺伝子の過剰発現を基盤としたものである。一方近年、21—29 塩基長の短鎖の 2 本鎖 RNA (small interfering RNA; siRNA) によって、配列特異的に標的遺伝子の発現を抑制する RNA 干渉 (RNA interference; RNAi) が注目されているが、アデノウイルスベクターを用いて siRNA を発現させることによっても遺伝子発現の抑制が可能である (Fig. 12)。今後はこのような遺

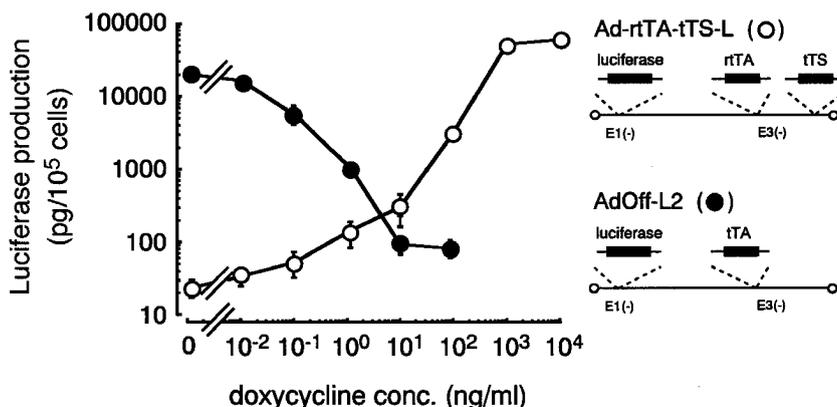


Fig. 11. Regulated Luciferase Expression in SK HEP-1 Cells Transduced with Adenovirus-Mediated Tet-off or Tet-on Systems

SK HEP-1 cells were transduced with AdOff-L2 (MOI=100) or Ad-rtTA-tTS-L (MOI=50), and cultured with medium only or medium containing various concentrations of doxycycline. After culture for 48 h, luciferase production in the cells was determined. Luciferase production in the non-transduced cells was  $0.5 \pm 0.2$  pg/ $10^5$  cells. The regulation factor is the ratio of maximum luciferase production to minimum luciferase production. The data are expressed as mean  $\pm$  S.D. ( $n=3$  or 4).

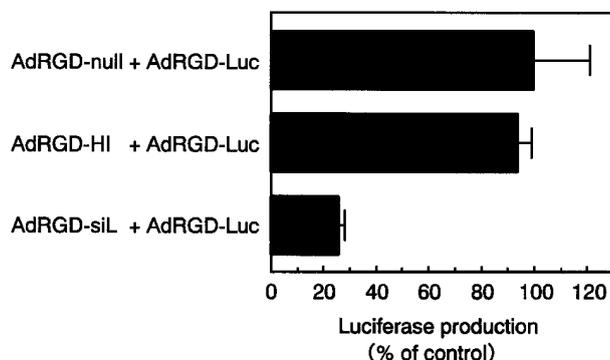


Fig. 12. Adenovirus-Mediated RNA Interference

HeLa cells were transduced with AdRGD-siL, AdRGD-HI, or AdRGD-null (3000 VP/cell), together with luciferase-expressing adenovirus vector, AdRGD-Luc (30 VP/cell), for 1.5 h. After culture for 48 h, luciferase production was measured by a luminescent assay. The data are expressed as mean  $\pm$  S.D. ( $n=4$ ).

伝子発現抑制を目的とした遺伝子治療においても、本稿で紹介したような様々なタイプの次世代アデノウイルスベクターは重要な基盤技術になると期待される。

遺伝子治療用ベクターは未来型の“薬”と捉えることもでき、“遺伝子治療薬”を製剤に例えると、導入遺伝子は薬効を発揮する主剤であり、ベクターは主剤の薬効を最大限、最適に発揮できるように設計された剤型である。本稿で述べたように、遺伝子工学的技術を利用してアデノウイルスベクター、すなわち剤型を改変することで、遺伝子治療における更なる有効性の向上、副作用の軽減が可能であり、疾病や標的組織に応じた最適なベクターの使用が可能になる。

遺伝子治療用ベクターの開発は、遺伝子機能解析研究に必須の遺伝子導入技術の開発にも直結することから、ゲノム研究全般における極めて重要な基盤技術となる。本稿で紹介した次世代アデノウイルスベクターは遺伝子機能解析研究に適した多くの長所を有しており、著者らの開発した技術が、遺伝子治療のみならず、ポストゲノム研究並びにゲノム科学・医療の発展に大きく貢献できることを期待している。

**謝辞** 本研究を遂行するにあたり、終始御指導を賜りました早川堯夫国立医薬品食品衛生研究所副所長に深謝致します。また、スタンフォード大学 Mark A. Kay 博士をはじめとする共同研究者の方々に心より感謝致します。

## REFERENCES

- 1) Bergelson J. M., Cunningham J. A., Droguett G., Kurt-Jones E. A., Krithivas A., Hong J. S., Horwitz M. S., Crowell R. L., Finberg R. W., *Science*, **275**, 1320–1323 (1997).
- 2) Wickham T. J., Mathias P., Cheresch D. A., Nemerow G. R., *Cell*, **73**, 309–319 (1993).
- 3) Greber U. F., Willetts M., Webster P., Helenius A., *Cell*, **75**, 477–486 (1993).
- 4) Leopold P. L., Ferris B., Grinberg I., Worgall S., Hackett N. R., Crystal R. G., *Hum. Gene Ther.*, **9**, 367–378 (1998).
- 5) Bett A. J., Haddara W., Prevec L., Graham F. L., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **91**, 8802–8806 (1994).
- 6) Mizuguchi H., Kay M. A., *Hum. Gene Ther.*, **10**, 2013–2017 (1999).
- 7) Mizuguchi H., Hayakawa T., *Gene*, **289**, 69–77 (2002).
- 8) Mizuguchi H., Kay M. A., *Hum. Gene Ther.*, **10**, 2013–2017 (1999).
- 9) Mizuguchi H., Kay M. A., Hayakawa T., *Adv. Drug Deli. Rev.*, **52**, 165–176 (2001).
- 10) Xu Z.L., Mizuguchi H., Mayumi T., Hayakawa T., *J. Control Rel.*, **81**, 155–163 (2002).
- 11) Xu Z.L., Mizuguchi H., Mayumi T., Hayakawa T., *Biochim. Biophys. Acta*, **1621**, 266–271 (2003).
- 12) Mizuguchi H., Koizumi N., Hosono T., Utoguchi N., Watanabe Y., Kay M.A., Hayakawa T., *Gene Ther.*, **8**, 730–735 (2001).
- 13) Koizumi N., Mizuguchi H., Utoguchi N., Watanabe Y., Hayakawa T., *J. Gene Med.*, **5**, 267–276 (2003).
- 14) Koizumi N., Mizuguchi H., Hosono T., Ishii-Watabe A., Uchida E., Utoguchi N., Watanabe Y., Hayakawa T., *Biochim. Biophys. Acta*, **1568**, 13–20 (2001).
- 15) Okada N., Tsukada Y., Nakagawa S., Mizuguchi H., Mori K., Saito T., Fujita T., Yamamoto A., Hayakawa T., Mayumi T., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **282**, 173–179 (2001).
- 16) Okada N., Saito T., Masunaga Y., Tsukada Y., Nakagawa S., Mizuguchi H., Mori K., Okada Y., Fujita T., Hayakawa T., Mayumi T., Yamamoto A., *Cancer Res.*, **61**, 7913–

- 7919 (2001).
- 17) Mizuguchi H, Hayakawa T., *Cancer Gene Ther.*, **9**, 236–242 (2000).
- 18) Okada Y., Okada N., Nakagawa S., Mizuguchi H., Takahashi K., Mizuno N., Fujita T., Yamamoto A., Hayakawa T., Mayumi T., *Jpn. J. Cancer Res.*, **93**, 436–444 (2002).
- 19) Okada Y., Okada N., Nakagawa S., Mizuguchi H., Kanehira M., Nishino N., Takahashi K., Mizuno N., Hayakawa T., Mayumi T., *Cancer Lett.*, **177**, 57–63 (2002).
- 20) Okada Y., Okada N., Mizuguchi H., Hayakawa T., Mayumi T., Mizuno N., *Gene Ther.*, **10**, 700–705 (2000).
- 21) Gao J.-Q., Tsuda Y., Katayama K., Nakayama T., Hatanaka Y., Tani Y., Mizuguchi H., Hayakawa T., Yoshie O., Tsutsumi Y., Mayumi T., Nakagawa S., *Cancer Res.*, **63**, 4420–4425 (2003).
- 22) Okegawa T., Pong R.C., Li Y., Bergelson J.M., Sagalowsky A.I., Hsieh J.T., *Cancer Res.*, **61**, 6592–6600 (2001).
- 23) Rauen K. A., Sudilovsky D., Le J. L., Chew K.L., Hann B., Weinberg V., Schmitt L. D., McCormick F., *Cancer Res.*, **62**, 3812–3818 (2002).
- 24) Roelvink P. W., Mi Lee G., Einfeld D. A., Kovesdi I., Wickham T. J., *Science*, **286**, 1568–1571 (1999).
- 25) Koizumi N., Mizuguchi H., Sakurai F., Yamaguchi T., Watanabe Y., Hayakawa T. (submitted).
- 26) Mizuguchi H., Koizumi N., Hosono T., Ishii-Watabe A., Uchida E., Utoguchi N., Watanabe Y., Hayakawa T., *Gene Ther.*, **9**, 769–776 (2002).
- 27) Sakurai F., Mizuguchi H., Hayakawa T., *Gene Ther.*, **10**, 1041–1048 (2003).
- 28) Sakurai F., Mizuguchi H., Yamaguchi T., Hayakawa T., *Mol. Ther.* (in press).
- 29) Mizuguchi H., Kay M. A., Hayakawa T., *Biotechniques*, **30**, 1112–1116 (2001).
- 30) Mizuguchi H., Hayakawa T., *J. Gene Med.*, **4**, 240–247 (2002).
- 31) Mizuguchi H., Xu Z. L., Sakurai F., Mayumi T., Hayakawa T. *Hum. Gene Ther.*, **14**, 1265–1277 (2003).
- 32) Gossen M., Bujard H., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **89**, 5547–5551 (1992).
- 33) Gossen M., Freundlieb S., Bender G., Muller G., Hillen W., Bujard H., *Science*, **268**, 1766–1769 (1995).
- 34) Mizuguchi H., Hayakawa T., *Biochim. Biophys. Acta*, **1568**, 21–29 (2001).