

## 標的指向能を有するバイオコンジュゲート化アデノウイルスベクターの開発

衛藤佑介,<sup>a</sup> 吉岡靖雄,<sup>a,b</sup> Ratima Asavatanabodee,<sup>a</sup> 水口裕之,<sup>a,c</sup>  
向 洋平,<sup>a</sup> 岡田直貴,<sup>a</sup> 中川晋作<sup>\*,a,b</sup>

## Development of PEGylated Adenovirus Vector for Cancer Gene Therapy

Yusuke ETO,<sup>a</sup> Yasuo YOSHIOKA<sup>a,b</sup>, Ratima ASAVATANABODEE<sup>a</sup>, Hiroyuki MIZUGUCHI<sup>a,c</sup>,  
Yohei MUKAI<sup>a</sup>, Naoki OKADA<sup>a</sup>, and Shinsaku NAKAGAWA<sup>\*,a,b</sup>

<sup>a</sup>Guraduate School of Pharmaceutical Sciences, Osaka University, 1-6 Yamadaoka, Suita City,  
565-0871 Japan, <sup>b</sup>MEI Center, Osaka University, 2-2 Yamadaoka, Suita City, 565-0871  
Japan, and <sup>c</sup>NIBIO, 7-6-8 Asagi Saito, Ibaraki City, 565-0085 Japan

(Received July 22, 2008)

Adenovirus vectors (Ad) have been frequently used for cancer gene therapy research because of their high gene transduction efficiency. However, systemic administration of conventional Ad can lead to the acute accumulation of virus particles and transgene expression in the liver, which may cause severe hepatotoxicity. For these reasons, clinical application of Ad for systemic administration has been limited, although intratumor administration of Ad has shown marked antitumor effects. Therefore, to promote the application of Ad in systemic cancer gene therapy, especially against the distant metastatic cancer, a novel Ad with marked accumulation in tumors and minimal hepatic distribution is needed. From this perspective, bioconjugation with polyethylene glycol (PEGylation) to Ad surface is a promising strategy, and we are trying to develop cancer targeted Ad by PEGylation approach. Through our study, we particularly clarified that PEGylated Ad (PEG-Ad) with optimized PEG modification ratio exhibited the enhanced distribution and gene expression in tumor tissue *via* systemic injection, which was based on the enhanced permeability and retention (EPR) effect. Moreover, PEG-Ad encoding therapeutic gene demonstrated not only stronger tumor-suppressive activity but also fewer hepatotoxic side effects compared with conventional Ad. In addition, we further attempted the active targeting using targeting ligand on the tip of PEG. We revealed that PEG-Ad with transferrin as a tumor targeting ligand could transduce more efficiently into tumor cells, which express transferrin receptor, compared with conventional PEG-Ad. In this symposium, I will present our approach for development of cancer targeted Ad by PEGylation.

**Key words**—adenovirus vector; polyethylene glycol; cancer gene therapy; targeting

## 1. はじめに

近年の分子生物学研究の進展により、疾患関連遺伝子の時空間的発現パターンが明らかとなるとともに、医薬品シーズとなり得る治療候補遺伝子も続々と同定されている。これら遺伝情報の集積を背景に、がん・エイズなどいまだ決定的治療法のない難治性疾患をも治療可能な夢の治療法として、遺伝子

そのものを「薬」とみなした遺伝子治療が注目されている。特に、世界的に死亡原因の上位を占めるがんに対するがん遺伝子治療は精力的に試みられており、外科的療法・化学療法・放射線療法などの従来法では治療困難な症例に対して治療成果を挙げるなど、次世代型治療法としてさらなる発展が期待されている。<sup>1-3)</sup> その一方で、現在の遺伝子導入技術(ベクター)の限界もクローズアップされてきた。今後遺伝子治療が実用化に至り、真の治療法として確立されるかは、治療コンセプトの合理性に加えて、遺伝子治療の根幹をなすベクター開発にかかっているといても過言ではない。

アデノウイルスベクター (Ad) は、1) 現存する遺伝子導入用ベクターの中で最も優れた遺伝子導入・発現効率を有する、2) 分裂細胞・非分裂細胞

<sup>a</sup>大阪大学大学院薬学研究科(〒565-0871 大阪府吹田市山田丘 1-6), <sup>b</sup>阪大 MEI センター(〒565-0871 大阪府吹田市山田丘 2-2), <sup>c</sup>医薬基盤研(〒567-0085 大阪府茨木市彩都あさぎ 7-6-8)

\*e-mail: nakagawa@phs.osaka-u.ac.jp

本総説は、日本薬学会第 128 年会シンポジウム GS3 で発表したものを中心に記述したものである。

本シンポジウムの序文及びこの他の総説は、Vol. 128, No. 11, p1557 に掲載。

を問わず遺伝子導入可能, 3) 容易に高力価のベクターが調製可能など *in vivo* 遺伝子治療用ベクターとして求められる基本的性質を兼ね備えている。そのため, Ad は遺伝子治療研究において現在最も繁用されており, がん遺伝子治療においても, 進行性の前立腺がんやグリオーマなどに対する臨床試験が国内外で多数進められ, 腫瘍マーカーの有意な低下が認められるなど良好な成績が得られている。<sup>4-6)</sup> さらに, 2003 年には中国において Ad によるがん遺伝子治療薬が世界に先がけて認可されるなど, Ad によるがん治療戦略は 21 世紀における画期的スタンダード医療にもなり得る可能性を秘めている。一方で, 現在のところ Ad の適用は, 肉眼で観察できるがん病巣への局所投与に限局されており, 微小がん病巣やがんによる死亡原因の第一位である転移がんなど, 全身投与が必要な症例に対する適用は皆無である。その主な原因として, Ad は全身投与において肝臓以外の組織移行性に乏しく, その大部分は肝臓に集積し, 致命的な肝障害を誘発するなどの問題点が挙げられる。<sup>7-9)</sup> したがって, 転移がんや微小がん病巣などをも治療可能な全身投与型がん遺伝子治療を実現するためには, Ad の優れた遺伝子発現能を保持しつつ, 1) 肝集積性の抑制, 2) 腫瘍組織移行性の向上を同時に達成し得るベクター設計が不可欠である。本観点からわれわれは, ポリエチレングリコール (PEG) 修飾によって Ad の体内動態制御を可能とする方法論の確立とそれを応用した最適ながん遺伝子治療法の開発を試みてきた。そこで本稿では, 腫瘍標的化を目指した体内動態制御型 Ad の創製及び標的指向性分子を介した能動的ターゲティングへの展開について, われわれの研究成果を中心に紹介する。

## 2. ポリエチレングリコール修飾アデノウイルスベクターの作製

高分子バイオコンジュゲーションは, タンパク質・粒子の生体内安定性を改善し, 医薬価値を飛躍的に向上可能な最適の DDS と世界的に認識されている。<sup>10)</sup> その中でも, PEG は全身投与における血中半減期が非常に長いことから, 全身投与における血中滞留性向上を目指したバイオコンジュゲーションにおいて最も汎用される高分子である。臨床においてもインターフェロン- $\gamma$  を PEG で修飾した PEGASYS・PEG-Intron が C 型肝炎の特効薬とし

て使用されるなど, 注目を集めている。さらに近年, ナノサイズの微粒子製剤の血中滞留性を飛躍的に向上し得るアプローチとして本 PEG 修飾法は幅広く利用されており, 抗がん剤ドキシソルビシン封入 PEG 化リポソームが認可されるなど, DDS 研究における基盤技術として期待されている。われわれもこれまでに, サイトカインのバイオコンジュゲーションを試み, 最適な高分子を選択した上で, 修飾率—*in vitro* での比活性—体内動態を体系的に評価することの重要性を提唱してきた。<sup>11,12)</sup> その上で, 目的疾患に応じた最適条件でバイオコンジュゲーションすることで, その治療域を飛躍的に拡大可能であることを示してきた。<sup>13-15)</sup>

一般に, PEG で修飾されたタンパク質や粒子は, PEG 鎖の立体障害により, 抗体や細網内皮系 (肝臓の類洞, 脾臓の静脈洞, リンパ管のリンパ洞などの内腔面を覆う細胞よりなる組織) による貪食作用からの回避能を獲得することで, 血中滞留性が延長することが知られている。<sup>16)</sup> また, 非規則的な血管新生が繰り返されている腫瘍組織では, 毛細血管の透過性が亢進しているため, 血中に長時間滞留している粒子は腫瘍血管より漏出し, 蓄積する現象がみられる。<sup>17,18)</sup> 前田らにより報告されたこの Enhanced Permeability and Retention Effect (EPR 効果) は, 現在高分子や微粒子をキャリアーに利用した腫瘍ターゲティングを考える上での基本コンセプトとなっている。したがって, Ad を最適条件で PEG 修飾すれば, PEG 鎖の立体障害により, 細網内皮系 (特に肝臓の Kupffer 細胞) への取り込みや, Ad の感染受容体である Coxsackie adenovirus receptor (CAR) を介した肝臓など正常組織への分布を抑制可能と考えられる (Fig. 1)。また, タンパク質や粒子の PEG 修飾と同様に血中滞留性の延長に基づく EPR 効果により腫瘍への受動的ターゲティングが期待される。しかしながら, Ad を含めてウイルスベクターの高分子修飾による体内動態制御は世界的にも成功例はなく, PEG 修飾率—体内動態—遺伝子発現活性の相互関連に関する基礎情報もほとんど存在しない。そこでわれわれは, 前述した Ad の有する問題点の克服並びに, 腫瘍を標的とし得るベクター開発を目指し, Ad 外殻タンパク質のリジン残基及び N 末端アミノ基に対する PEG 修飾による PEG 修飾 Ad (PEG-Ad) の創製に取り組むとともに

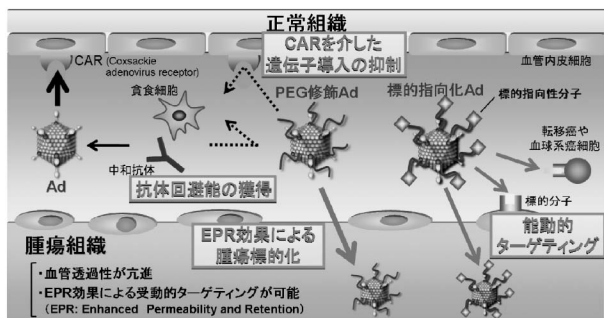


Fig. 1. Characteristics of PEGylated Ad

Table 1. Relationship between Degree of PEGylation and Vector Size

Ratio <sup>a)</sup> (Ad : PEG)	Modification ratio <sup>b)</sup> (%)	Vector size (nm)
1 : 0 (unmodified)	0	113.3 ± 0.8
1 : 25	10	120.6 ± 0.6
1 : 100	34	123.8 ± 1.0
1 : 400	61	128.5 ± 1.3
1 : 1600	89	137.6 ± 0.9
1 : 6400	100	148.2 ± 1.5

a) Ad lysine residues : PEG (mol : mol). b) Signal intensity of PEGylated hexon / (signal intensity of PEGylated hexon + signal intensity of unmodified hexon) × 100.

に、修飾率の異なる一連の PEG-Ad を作製し (Table 1), PEG 修飾率に応じたベクター特性の体系的な評価を試みた。

### 3. PEG-Ad の体内動態と遺伝子発現特性に関する体系的解析

サイトカインなどの生理活性タンパク質などに対するバイオコンジュゲーションでは、バイオコンジュゲート体の体内動態及び活性は、修飾に用いる高分子の種類・鎖長 (分子サイズ)・修飾状態 (PEG 密度など) に強く影響されることが知られている。<sup>11,19)</sup> 一般には、用いた PEG 鎖の分子量が大きく、高修飾体であるほど、血中滞留性の延長や腫瘍集積性が增大する一方で、PEG 鎖の立体障害により標的組織・細胞におけるレセプターとの結合が阻害され、比活性が低下することが知られている。同様の現象は、PEG-Ad においても観察されると考えられるため、まず PEG 修飾率に応じた PEG-Ad の血中滞留性を、単回尾静脈内投与後の血液中 Ad 量をリアルタイム PCR 法で定量することで評価した (Fig. 2)。その結果、未修飾 Ad では血中半減期

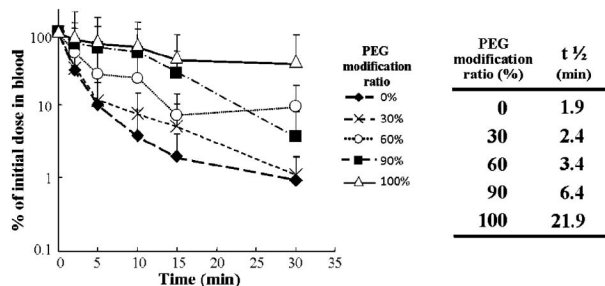


Fig. 2. Blood Kinetics of PEG-Ad after Intravenous Injection

Normal female BALB/c mice were injected intravenously with 10<sup>11</sup> particles of unmodified Ad or PEG-Ad with the modification ratios indicated. The concentration of Ad in the blood (mean ± S.D., n=5) at various time points was determined by real-time quantitative PCR.

がわずかに 1.9 分と血液中から速やかに消失するのに対して、PEG-Ad では PEG 修飾率の増大に伴い血中滞留性の飛躍的な延長が認められ、血中半減期は最大 10 倍以上に達した。続いて、Meth-A 担がんマウスに単回尾静脈内投与後の腫瘍及び肝臓への Ad 粒子移行量をリアルタイム PCR 法により評価したところ、修飾率の増大に伴い EPR 効果に基づくと考えられる腫瘍集積性の増大が認められ、未修飾 Ad と比較して最大 100 倍もの集積がみられた (Fig. 3)。さらに、副作用の原因となる肝臓への分布は修飾率の増大に伴い低下し、未修飾 Ad と比較して最大 1/30 以下にまで抑制された。ヒトにおいては、Ad が血球細胞に吸着することで、血中滞留性及び体内動態に影響する可能性が報告されている。<sup>20)</sup> そこで、PEG-Ad とマウス血球細胞の相互作用を検討したが、未修飾 Ad と同様に血球細胞への吸着はほとんど観察されなかった (Data not shown)。以上の結果から、Ad の PEG 修飾により、CAR を介した急速な組織分布や、貪食細胞からの取り込みを抑制可能であり、その結果、飛躍的な血中滞留性の増大と体内動態制御を可能にすると考えられた。

続いて、PEG-Ad の *in vivo* 遺伝子発現活性を、Meth-A 担がんマウスを用いて検討した (Fig. 4)。各 Ad を単回尾静脈内投与後の各臓器における遺伝子発現活性を評価したところ、PEG-Ad は PEG 修飾率に応じたベルシェイプ型の遺伝子発現特性を示した。この詳細な原因は不明であるが、血中滞留性の向上、細網内皮系からの取り込み回避や、血流から生じる圧力により PEG-Ad が細胞表面へ接触し

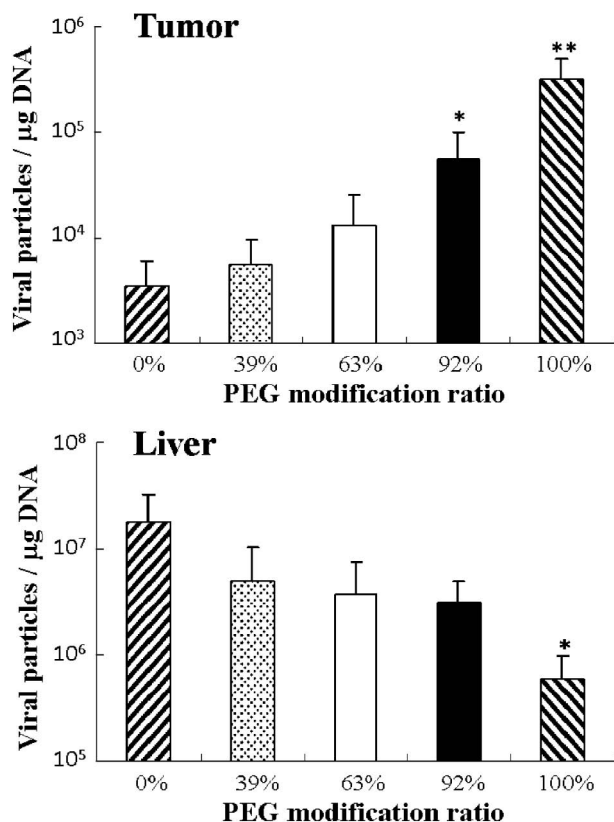


Fig. 3. Tissue Distribution of Ad and PEG-Ad

Once the tumor diameter was approximately 7 mm, Meth-A tumor-bearing mice were injected intravenously with  $10^{11}$  particles of Ad or PEG-Ad. Six hours after the injection, the tumor and liver tissues were harvested and DNA extracted. The number of viral genomes in each sample was measured by real-time quantitative PCR. Data are presented as means  $\pm$  S.D. ( $n=5$ , \* $p<0.05$ , \*\* $p<0.01$  compared with value for unmodified Ad).

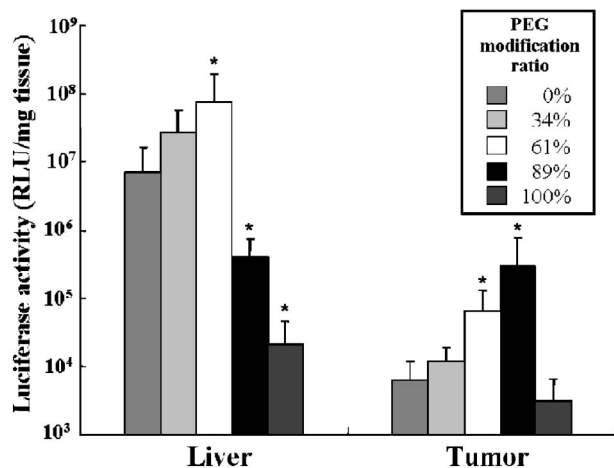


Fig. 4. Transgene Expression of Ad and PEG-Ad

Once the tumor diameter was approximately 7 mm, Meth-A tumor-bearing mice were injected intravenously with  $10^{10}$  particles of Ad or PEG-Ad. After 48 h, each tissue was harvested, and luciferase activity was measured. Data are presented as means  $\pm$  S.E. ( $n=4$ , \* $p<0.05$  compared with value for unmodified Ad). RLU, relative light units.

易くなるなどの *in vivo* におけるいくつかの要因が影響しているものと考えられる。また、腫瘍移行性が最も高かった修飾率 100% の PEG-Ad では、逆に遺伝子発現活性の低下がみられた。本結果より、PEG 修飾率が高すぎる場合は、各組織への分布量に係わらず、PEG 鎖の立体障害により細胞内への取り込み、あるいは取り込み後の核移行が強く抑制されるため、遺伝子発現に至らない可能性が示唆された。さらに、各修飾率の PEG-Ad のうち、修飾率約 90% の PEG-Ad が腫瘍において未修飾 Ad と比較して 40 倍以上と最も高い遺伝子発現活性を示した。同時に正常組織における遺伝子発現を抑制し、特に副作用の原因となる肝臓での遺伝子発現活性は未修飾 Ad の約 1/20 に抑制されており、腫瘍と肝臓ではほぼ同等の遺伝子発現活性を示すという興味深い知見が得られた。全身投与においてこれほどまで強い腫瘍選択的な遺伝子発現を達成した例はなく、腫瘍標的化ベクターとして極めて有望と考えられる。以上の結果より、EPR 効果など様々な要因を含む *in vivo* においては、腫瘍での遺伝子発現活性を増強し、肝臓では低下し得る、至適修飾条件（修飾率約 90%）が存在することが明らかとなった。

#### 4. PEG-Ad の EPR 効果を利用したがん遺伝子治療への応用

現在、がん遺伝子治療における治療遺伝子としてサイトカインが繁用されており、2007 年の時点で全臨床試験プロトコールの 19% を占めている。多様な生理活性を有するサイトカインの中でも、強い抗腫瘍作用を有する腫瘍壊死因子 ( $\text{TNF}\alpha$ ) は医薬品シーズとして注目されている。 $\text{TNF}\alpha$  の抗腫瘍作用は、直接的な腫瘍細胞傷害、抗腫瘍免疫の活性化、腫瘍血管内皮への傷害、などにより誘導されることが知られている。<sup>21,22)</sup> しかし、肝臓などの正常組織に作用した場合は、強烈的な免疫応答の惹起に伴う致命的な副作用を誘導するため、全身性のタンパク療法や遺伝子治療への適用は困難とされている。<sup>23,24)</sup> 本観点から、 $\text{TNF}\alpha$  をわれわれが見出した修飾率約 90% の腫瘍標的化 PEG-Ad に適用することで、副作用の原因となる肝臓での発現を抑制しつつ、その発現を腫瘍に局限できれば、副作用なく強力な抗腫瘍効果のみを引き出し得ると期待される。そこでわれわれは、 $\text{TNF}\alpha$  発現 Ad (Ad- $\text{TNF}\alpha$ )

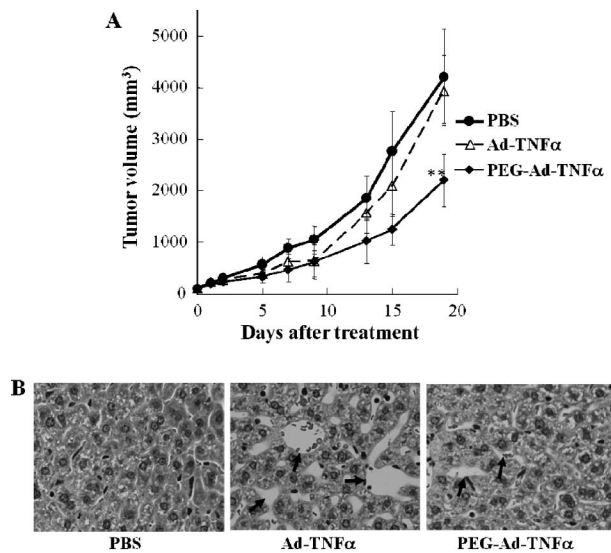


Fig. 5. Therapeutic Effectiveness of Systemically Injected PEG-Ad-TNF $\alpha$  against Meth-A Tumors in Mice

PBS,  $10^{10}$  particles of Ad expressing luciferase, or  $10^{10}$  particles of Ad or PEG-Ad (90% modification ratio) expressing TNF- $\alpha$  were injected into Meth-A tumor-bearing mice (tumor diameter, about 8 mm). (A) Antitumor effect of PEG-Ad after intravenous injection. Tumor volume was measured 2 or 3 times each week. Each point represents mean  $\pm$  S.E. ( $n=6$  to  $8$ ,  $**p < 0.01$  compared with value for unmodified Ad). (B) Histopathologic analysis of liver toxicity. Livers were harvested 48 h after injection of Ad, placed in neutral 10% formalin, and then embedded in paraffin. Sections ( $5 \mu\text{m}$ ) were prepared for hematoxylin and eosin staining and histopathologic examination. Original magnification,  $300\times$ . Arrows indicate vacuolation due to hepatotoxicity.

を用い、バイオコンジュゲート化 Ad の原発がん並びに転移がん治療における有用性評価を試みた。

原発がんモデルである Meth-A 担がんマウスに対する、Ad-TNF $\alpha$  及び修飾率 90% の PEG-Ad-TNF $\alpha$  の抗腫瘍効果を検討した (Fig. 5)。Meth-A 担がんマウスに、各 Ad を単回尾静脈内投与し、腫瘍体積を評価した結果、Ad-TNF $\alpha$  投与群では、腫瘍増殖がコントロール群と同等であり抗腫瘍効果が全く観察されなかったのに対して、PEG-Ad-TNF $\alpha$  投与群では、Ad-TNF $\alpha$  投与群と比較して有意な腫瘍増殖抑制がみられた。さらに副作用の指標として Ad 投与後 2 日目の肝臓病理組織を観察した結果、Ad-TNF $\alpha$  投与群では多くのマウスにおいて、肝障害の指標である小空胞が多数観察されたのに対して、PEG-Ad-TNF $\alpha$  投与群では肝障害の軽減がみられた。以上の結果は、PEG 修飾により副作用につながる肝臓での TNF $\alpha$  の発現量が低下するとともに、EPR 効果により腫瘍における TNF $\alpha$  の発現量が増加したためであると考えられる。Ad の単回全身投与において有効性 (抗腫瘍効果) と安全性の向上

(重篤な副作用である肝障害の軽減) を同時に達成可能な本アプローチは、膵臓がんなどの外科的切除が困難とされるがん種への適用に有用性を発揮すると期待される。

続いて、局所投与が不可能な B16BL6 メラノーマの肺転移がんモデルマウスに対して、Ad-TNF $\alpha$  及び修飾率 90% の PEG-Ad-TNF $\alpha$  の有用性を検討した。Ad を全身投与 1 週間後の肺転移コロニー数を測定したところ、Ad-TNF $\alpha$  投与群ではコントロール投与群と比較して転移コロニー数はほとんど軽減しないのに対して、PEG-Ad-TNF $\alpha$  投与群では顕著な肺転移コロニー数の減少がみられた (Data not shown)。以上の結果より、われわれが見出した腫瘍標的化に最適な修飾率約 90% の PEG-Ad は、原発がんのみならず転移がんに対しても有効であることが明らかとなった。一般的に、腫瘍サイズが約 2 mm を超えれば活発な血管新生が起きており EPR 効果が期待できるものの<sup>25,26</sup> これまでに転移がんに対して EPR 効果を発揮した例は少ない。したがって、今後は転移巣への PEG-Ad 移行能など詳細な検討を進めるとともに、臨床でも大きな問題であるリンパ節転移などほかの転移がんモデルを含めたより一層の基礎情報の集積が望まれる。さらには、現在がん遺伝子治療臨床試験で汎用される自殺遺伝子 HSVtk や、サイトカイン IL-12 を用いた検討を進めることで、有効性・安全性により優れた PEG-Ad の創製が期待される。

一方で、本検討を通じ、さらなる改良の必要性もみえてきた。本治療実験で用いた Ad 量は 1 若しくは  $3 \times 10^{10}$  ウイルス粒子/マウスであり、ヒトへの適用を考慮した場合、3 若しくは  $9 \times 10^{13}$  ウイルス粒子/60 kg となる。 $10^{14}$  ウイルス粒子/60 kg で全身投与した場合、致命的な副作用を招く危険性が示唆されていることを考えると、より低容量でより効果的に抗腫瘍効果を発揮可能にする必要がある。そのため、現在の PEG-Ad は受動的ターゲティングにより抗腫瘍効果を発揮するものであるが、能動的ターゲティングを可能とする標的細胞選択性が付与された PEG-Ad の開発が期待されている。本観点から、われわれは続いて標的細胞選択型 PEG-Ad の創製に向けた基礎検討を行った。さらに、本検討において PEG 修飾により肝障害を軽減可能であるものの、コントロール群と比較すると依然とし

て若干の肝障害が観察されている。この点も今後の検討課題であり、われわれは現在、腫瘍特異的な転写活性を有する TERT プロモーターを搭載した Ad の PEG 化に取り組んでおり、肝臓など正常組織における遺伝子発現をさらに低下させることで、副作用を完全に抑制可能な有効性・安全性により優れた新規ベクターの創製に取り組んでいる。

本アプローチは、非常に汎用性に優れ、既存の多様なベクターに対して容易に応用可能な基盤技術である。われわれは現在、遺伝子組み込み型ウイルスベクターであるレトロウイルスベクターやレンチウイルスベクターへの本アプローチの適用も視野に入れている。さらに、近年急速に開発が進められている腫瘍溶解性ウイルス（腫瘍細胞特異的に増殖して細胞を溶解する）への応用も注目される。腫瘍溶解性ウイルスの場合は、一定量のウイルスを腫瘍組織へ送達することさえできれば、移行したウイルスが腫瘍組織で自己増殖を繰り返し、強力な抗腫瘍効果が期待できるという特徴を有している。<sup>27-29</sup> 本観点から、腫瘍溶解性ウイルスに対する本アプローチの適用は、初回全身投与時の腫瘍移行性を増強させるという点で優れているのみならず、腫瘍組織で自己増殖したウイルスは PEG 修飾されていないことから本来の高い感染力を有しており、強力な抗腫瘍効果が望めるという、極めて合理的な治療戦略であると言える。

本検討では分子量 5000 の直鎖状 PEG を使用したが、PEG 分子量や形状の違いにより体内動態や遺伝子発現特性が異なる可能性は十分に予想される。当研究室では現在、本研究成果を基盤として、異なる分子量・形状を有する PEG による検討を進めることで修飾する PEG 鎖の最適化を目指した研究を推進中である。また、本アプローチは PEG に限らず他の高分子にも応用可能なことから、あらゆる疾患への適用が期待される。当研究室では、Polyvinylpyrrolidone (PVP) が PEG よりも優れた血中滞留性を有すること。<sup>30-32</sup> また腎臓や脾臓などの臓器特異的に集積する新規高分子をも見出し出していることから、<sup>33</sup> 今後これらインテリジェントな機能を有する高分子を適用することで、より有効性・安全性に優れた機能性バイオコンジュゲート化 Ad の設計が可能となるものと考えられる。したがって、今後あらゆる病態に対して目的作用を発揮可能

なバイオコンジュゲート化 Ad を設計するには、個々に最適な高分子を選択した上で、修飾率—*in vitro* 遺伝子発現活性—血中滞留性—粒子分布—*in vivo* 遺伝子発現活性の相互連関を評価することが重要と考えられる。

## 5. 標的指向性分子を付与した PEG-Ad の創製と機能評価

近年、腫瘍細胞で特異的に発現する分子が数多く同定され、それらに対するターゲティング分子を用いたミサイル療法に期待が寄せられている。したがって、PEG-Ad の PEG 鎖先端に腫瘍細胞特異的分子に対するターゲティング分子を付与できれば、EPR 効果による腫瘍集積性の向上など PEG 修飾の利点を有しつつ、腫瘍細胞選択的な能動的ターゲティングが可能になると考えられる。しかしながら、PEG-Ad に標的指向性を付与した例は少なく、ターゲティング分子の PEG 鎖先端への結合方法などの基礎情報すら皆無である。そこでまずわれわれは、標的指向性 PEG-Ad の創製に向けた基礎検討として、PEG 鎖先端にインテグリンに対して特異的な結合活性を有する RGD ペプチド (YGGRGDTP)<sup>34-36</sup> を付与した PEG-Ad (RGD-PEG-Ad) の作製を試み、インテグリン指向性ベクターとしての遺伝子発現特性を検討することで本アプローチの有用性を評価した。フィブロネクチン由来 RGD ペプチドは、がん細胞を含む多くの細胞表面に発現するインテグリンと非常に強い結合活性を示し、エンドサイトーシスにより取り込まれることが知られている。<sup>37</sup>

PEG 鎖先端への RGD ペプチドの結合法としては、両末端に異なる活性基を有する両末端活性型 PEG (市販品) を用いる方法などが知られているが、本研究では PEG 鎖の片方の末端に対して 2 つの RGD ペプチドが提示され、片方の末端がアミノ基指向性活性基である *N*-hydroxy succinimidyl ester (NHS) を有する独自の RGD-PEG-NHS を化学合成した。本 RGD-PEG-NHS では、表面へ提示するペプチド量が通常の 2 倍であることから、標的指向化能がより強く得られるものと期待される。PEG 修飾と同様に Ad の外殻タンパク質のリジン残基及び *N* 末端アミノ基を標的として、修飾率 36% の RGD-PEG-Ad を作製し、CAR 発現量の異なる 2 種類の細胞を用いて標的指向性分子を介した遺伝子発現特性評価を試みた (Fig. 6)。CAR 低発現・イ

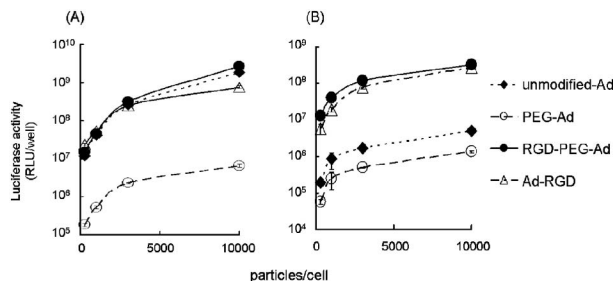


Fig. 6. Transduction Efficiency of RGD-PEG-Ad into A549 Cells and B16BL6 Cells

(A) A549 ( $2 \times 10^4$  cells) cells and (B) B16BL6 cells ( $2 \times 10^4$  cells) were transduced with 300, 1000, 3000 or 10000 particles/cell of unmodified-Ad, PEG-Ad, RGD-PEG-Ad or Ad-RGD, respectively. Luciferase expression was measured after 24 h. Each point represents the mean  $\pm$  S.D. ( $n=3$ ).

インテグリン高発現の B16BL6 細胞において、未修飾 Ad では遺伝子発現活性は低く、PEG-Ad ではさらに低い活性を示す一方で、RGD-PEG-Ad は、未修飾 Ad の約 100 倍、PEG-Ad より数百倍高い遺伝子発現活性を示した。さらに、RGD-PEG-Ad は Ad の外殻を構成するファイバー部分に RGD 配列を挿入することで、インテグリン発現細胞に対して高い遺伝子発現を達成可能なファイバーミュータント Ad-RGD<sup>38-42)</sup> と同等の活性を有することが判明した。また、RGD-PEG-Ad による高い遺伝子発現活性は、CAR 高発現・インテグリン高発現の A549 細胞においても同様に確認された。CAR 低発現細胞に対してこれほど高い遺伝子発現活性を示す報告は少なく、標的指向性分子を Ad 表面に多数提示させる本アプローチが、遺伝子導入・発現効率に非常に優れた方法論であることが示唆された。また、過剰量の RGD ペプチド存在下における競合阻害実験により、RGD-PEG-Ad が CAR との結合によらず、インテグリン特異的に結合して遺伝子導入することを確認している (Data not shown)。本研究で用いた RGD-PEG-Ad は、全身の組織に発現するインテグリンを標的とした標的指向化モデル Ad であるため、*in vitro* における基礎検討には適しているものの、*in vivo* 全身投与における体内動態に関する検討はできない。しかし今後、組織特異的な結合性を有する標的指向性分子を本アプローチに適用することで、有効性・安全性に優れた標的指向化 Ad を作製し得る可能性が示唆された。

また、本検討では修飾率約 40% の RGD-PEG-Ad を用いているが、われわれは RGD-PEG 修飾率の

低下に伴い、CAR 低発現細胞に対する遺伝子発現活性が低下することを確認している。この事実は逆に、RGD-PEG を用いてより高い修飾率の Ad を作製すれば、ウイルス当たりの RGD 分子も多く提示されることになり、結果的にインテグリンを介した遺伝子導入効率が上昇する可能性を示唆している。すなわち、標的指向性分子を付与したバイオコンジュゲート化 Ad の場合には、修飾率の増大に伴い、標的指向性分子の作用が強く現れるだけでなく、Ad に対する中和抗体からの回避能も増大すると考えられることから、本方法は理想的な遺伝子治療用ベクターとして創製できる可能性を示している。また、本研究で作製した RGD-PEG-Ad は、優れた遺伝子導入・発現活性を有していることから、標的指向化モデルとしての適用のみならず、遺伝子治療用ベクターとしての適用も可能である。RGD-PEG-Ad は、中和抗体回避能を有しつつ、RGD を介してあらゆる細胞に遺伝子導入可能であることから、経肺・経鼻・直腸投与などの局所投与においては、従来型 Ad や Ad-RGD と比較して有効性の向上も十分に見込めると期待される。

Ad に標的指向化能を付与する試みは、これまでも様々な方法で検討されており、Ad と CAR との結合を担うファイバータンパク質に様々な標的化ペプチドを遺伝子工学的に組み込む方法が最も試みられてきた。しかしながら、この方法ではペプチドに応じて新たに Ad をゲノム段階から作製する煩雑さに加えて、構造上の問題からウイルスとして形成されてこない場合も多い。さらにペプチド本来の結合活性と比較して親和性が低下するケースも頻発し、汎用性の面で課題を抱えている。一方、本研究アプローチは、化学的に合成した標的指向化 PEG を既存の Ad と結合させるという非常に汎用性に優れた方法である。また、標的化ペプチドも比較的柔軟性に富んだ状態で提示可能なことから、活性低下も生じ難いと考えられる。本観点からも、能動的ターゲティングにおけるバイオコンジュゲーションの応用は、有望なアプローチであると言える。

ターゲティング能を有する Ad を開発する上で最も重要なのが、標的指向性分子の選択であり、この点に関しては、ファージ表面提示法を駆使した特異性の高い標的リガンド分子の網羅的な探索法が最適であると考えられる。Ruoslahti らは、本方法によ

り腫瘍指向性ペプチド, 脳移行性ペプチドなど様々な組織へ移行活性を有するペプチドを既に多数報告しており,<sup>43-46)</sup> 本アプローチへも容易に適用可能である。さらに, 標的指向性分子として抗体 (あるいは一本鎖抗体) を利用すれば, 結合力・特異性に一層優れた標的指向化 Ad を創製できるものと考えられる。この場合, タンパク質と PEG 融合体を化学的に合成することは不可能なため, 両末端活性型の PEG を用い, まずタンパク質と PEG を反応させたのち, この複合体を Ad と反応させることとなる。本方法に関しても, いまだ確立した方法論はないが, 現在当研究室においても検討を進めている。これら標的指向性分子を付与した PEG-Ad は, 正常細胞・組織に対する副作用の軽減, 原発がんや転移がんなどに対する標的指向化に加えて, リンフォーマなどの血球系がん細胞などを対象とした遺伝子治療への応用も可能となることから, 理想的な遺伝子治療用ベクターになり得る可能性を秘めている。したがって今後は, 細胞・組織特異的な結合性を有する標的指向性分子を探索し, 前述した腫瘍標的化に最適な修飾率約 90% の PEG-Ad に適用するとともに, PEG 修飾率一標的指向性分子提示量一体内動態一遺伝子発現活性の相互連関を明らかにすることで, 能動的ターゲティングに最適な標的指向化 Ad が創製できるものと期待される。

## 6. おわりに

ポストシーケンス時代を迎え, 新規遺伝子の機能解明が今後さらに進むことで, 治療遺伝子の候補は急速に増加することが予想される。このような背景から, 今後の遺伝子治療の実用化と一層の進展に向けての最大の鍵は, 高い安全性を確保しつつ, 目的遺伝子を必要な細胞に効率よく導入し, 安定して発現させ得る遺伝子導入技術 (ベクター) の開発にあると言える。本稿では, Ad のバイオコンジュゲーションに関する体系的な解析により, ウイルスベクターにおいて世界初となる, 受動的ターゲティングに基づく腫瘍標的化 Ad の創出に成功し, さらに本ベクターを基盤とした能動的ターゲティングに資する基礎情報を示した。このような新規ベクター開発を志向した体系的な機能連関評価は, 病態に応じた最適な DDS (体内動態・遺伝子発現特性) を発揮し得るベクター設計に不可欠であり, これにより初めて治療戦略が明確で合理的な遺伝子治療が実

現できるものと考えられる。また, 本研究成果は, PEG のみにとどまらず様々な機能性修飾高分子に適用可能であり, 遺伝子改変型 Ad (ファイバーミュータント Ad・gutless Ad など) や, レトロウイルスベクター, 腫瘍溶解性 Ad などの多様なベクターに対して応用可能な基盤技術である。今後組織移行性・特異性に優れた標的指向性分子を選択し, 標的指向性分子の提示量の最適化を含めたさらなる連関評価を図り, さらに遺伝子改変によるベクター開発戦略と融合することで, あらゆる組織を標的とし得る理想的な標的指向化 Ad の開発が可能になるものと期待される。

**謝辞** 本研究に際し, RGD-PEG を供与頂いた神戸学院大学川崎紘一教授, 前田光子先生に感謝致します。

## REFERENCES

- 1) Morgan R. A., Dudley M. E., Wunderlich J. R., Hughes M. S., Yang J. C., Sherry R. M., Royal R. E., Topalian S. L., Kammula U. S., Restifo N. P., Zheng Z., Nahvi A., de Vries C.R., Rogers-Freezer L. J., Mavroukakis S. A., Rosenberg S. A., *Science*, **314**, 126-129 (2006).
- 2) Urnov F. D., Miller J. C., Lee Y. L., Beausejour C. M., Rock J. M., Augustus S., Jamieson A. C., Porteus M. H., Gregory P. D., Holmes M. C., *Nature*, **435**, 646-651 (2005).
- 3) Cavazzana-Calvo M., Hacein-Bey S., de Saint Basile G., Gross F., Yvon E., Nusbaum P., Selz F., Hue C., Certain S., Casanova J. L., Bousso P., Deist F. L., Fischer A., *Science*, **288**, 669-672 (2000).
- 4) St George J. A., *Gene Ther.*, **10**, 1135-1141 (2003).
- 5) Gallo P., Dharmapuri S., Cipriani B., Monaci P., *Gene Ther.*, **12 Suppl 1**, S84-91 (2005).
- 6) Fujiwara T., Tanaka N., Kanazawa S., Ohtani S., Saijo Y., Nukiwa T., Yoshimura K., Sato T., Eto Y., Chada S., Nakamura H., Kato H., *J. Clin. Oncol.*, **24**, 1689-1699 (2006).
- 7) Alemany R., Suzuki K., Curiel D. T., *J. Gen. Virol.*, **81**, 2605-2609 (2000).
- 8) Wohlfart C., *J. Virol.*, **62**, 2321-2328 (1988).



- 9) Worgall S., Wolff G., Falck-Pedersen E., Crystal R. G., *Hum. Gene Ther.*, **8**, 37–44 (1997).
- 10) Delgado C., Francis G. E., Fisher D., *Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst.*, **9**, 249–304 (1992).
- 11) Yamamoto Y., Tsutsumi Y., Yoshioka Y., Nishibata T., Kobayashi K., Okamoto T., Mukai Y., Shimizu T., Nakagawa S., Nagata S., Mayumi T., *Nat. Biotechnol.*, **21**, 546–552 (2003).
- 12) Tsutsumi Y., Kihira T., Tsunoda S., Kamada H., Nakagawa S., Kaneda Y., Kanamori T., Mayumi T., *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **278**, 1006–1011 (1996).
- 13) Yoshioka Y., Tsutsumi Y., Ikemizu S., Yamamoto Y., Shibata H., Nishibata T., Mukai Y., Okamoto T., Taniai M., Kawamura M., Abe Y., Nakagawa S., Nagata S., Yamagata Y., Mayumi T., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **315**, 808–814 (2004).
- 14) Shibata H., Yoshioka Y., Ikemizu S., Kobayashi K., Yamamoto Y., Mukai Y., Okamoto T., Taniai M., Kawamura M., Abe Y., Nakagawa S., Hayakawa T., Nagata S., Yamagata Y., Mayumi T., Kamada H., Tsutsumi Y., *Clin. Cancer Res.*, **10**, 8293–8300 (2004).
- 15) Tsunoda S., Ishikawa T., Yamamoto Y., Kamada H., Koizumi K., Matsui J., Tsutsumi Y., Hirano T., Mayumi T., *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **290**, 368–372 (1999).
- 16) Harris J. M., Chess R. B., *Nat. Rev. Drug Discov.*, **2**, 214–221 (2003).
- 17) Maeda H., Sawa T., Konno T., *J. Control. Release*, **74**, 47–61 (2001).
- 18) Matsumura Y., Maeda H., *Cancer Res.*, **46**, 6387–6392 (1986).
- 19) Tsutsumi Y., Kihira T., Tsunoda S., Kanamori T., Nakagawa S., Mayumi T., *Br. J. Cancer*, **71**, 963–968 (1995).
- 20) Lyons M., Onion D., Green N. K., Aslan K., Rajaratnam R., Bazan-Peregrino M., Phipps S., Hale S., Mautner V., Seymour L. W., Fisher K. D., *Mol. Ther.*, **14**, 118–128 (2006).
- 21) Havell E. A., Fiers W., North R. J., *J. Exp. Med.*, **167**, 1067–1085 (1988).
- 22) Wright S. C., Kumar P., Tam A.W., Shen N., Varma M., Larrick J. W., *J. Cell. Biochem.*, **48**, 344–355 (1992).
- 23) Furman W. L., Strother D., McClain K., Bell B., Leventhal B., Pratt C. B., *J. Clin. Oncol.*, **11**, 2205–2210 (1993).
- 24) Moritz T., Niederle N., Baumann J., May D., Kurschel E., Osieka R., Kempeni J., Schlick E., Schmidt C. G., *Cancer Immunol. Immunother.*, **29**, 144–150 (1989).
- 25) Folkman J., *Nat. Med.*, **1**, 27–31 (1995).
- 26) Skinner S. A., Tutton P. J., O'Brien P. E., *Cancer Res.*, **50**, 2411–2417 (1990).
- 27) Hedley S. J., Chen J., Mountz J. D., Li J., Curiel D. T., Korokhov N., Kovetski I., *Cancer Immunol. Immunother.*, **55**, 1412–1419 (2006).
- 28) Oosterhoff D., van Beusechem V. W., *J. Exp. Ther. Oncol.*, **4**, 37–57 (2004).
- 29) Sonabend A. M., Ulasov I. V., Lesniak M. S., *Rev. Med. Virol.*, **16**, 99–115 (2006).
- 30) Kamada H., Tsutsumi Y., Yamamoto Y., Kihira T., Kaneda Y., Mu Y., Kodaira H., Tsunoda S. I., Nakagawa S., Mayumi T., *Cancer Res.*, **60**, 6416–6420 (2000).
- 31) Kaneda Y., Tsutsumi Y., Yoshioka Y., Kamada H., Yamamoto Y., Kodaira H., Tsunoda S., Okamoto T., Mukai Y., Shibata H., Nakagawa S., Mayumi T., *Biomaterials*, **25**, 3259–3266 (2004).
- 32) Tsunoda S., Kamada H., Yamamoto Y., Ishikawa T., Matsui J., Koizumi K., Kaneda Y., Tsutsumi Y., Ohsugi Y., Hirano T., Mayumi T., *J. Control. Release*, **68**, 335–341 (2000).
- 33) Yoshioka Y., Tsutsumi Y., Mukai Y., Shibata H., Okamoto T., Kaneda Y., Tsunoda S., Kamada H., Koizumi K., Yamamoto Y., Mu Y., Kodaira H., Sato-Kamada K., Nakagawa S., Mayumi T., *J. Biomed. Mater. Res.*, **70**, 219–223 (2004).
- 34) Ruoslahti E., Pierschbacher M. D., *Science*, **238**, 491–497 (1987).
- 35) Ruoslahti E., *Kidney Int.*, **51**, 1413–1417 (1997).
- 36) Plow E. F., Pierschbacher M. D., Ruoslahti E., Marguerie G., Ginsberg M.H., *Blood*, **70**, 110–115 (1987).
- 37) Erbacher P., Remy J. S., Behr J. P., *Gene Ther.*, **6**, 138–145 (1999).
- 38) Mizuguchi H., Koizumi N., Hosono T.,

- Utoguchi N., Watanabe Y., Kay M.A., Hayakawa T., *Gene Ther.*, **8**, 730–735 (2001).
- 39) Koizumi N., Mizuguchi H., Utoguchi N., Watanabe Y., Hayakawa T., *J. Gene Med.*, **5**, 267–276 (2003).
- 40) Gao J.Q., Kanagawa N., Motomura Y., Yanagawa T., Sugita T., Hatanaka Y., Tani Y., Mizuguchi H., Tsutsumi Y., Mayumi T., Okada N., Nakagawa S., *Gene Ther.*, **14**, 491–502 (2007).
- 41) 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).
- 42) Okada N., Masunaga Y., Okada Y., Mizuguchi H., Iiyama S., Mori N., Sasaki A., Nakagawa S., Mayumi T., Hayakawa T., Fujita T., Yamamoto A., *Gene Ther.*, **10**, 1891–1902 (2003).
- 43) Ruoslahti E., *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, **12**, 697–715 (1996).
- 44) Kumar P., Wu H., McBride J. L., Jung K. E., Kim M. H., Davidson B. L., Lee S. K., Shankar P., Manjunath N., *Nature*, **448**, 39–43 (2007).
- 45) Pilch J., Brown D. M., Komatsu M., Jarvinen T. A., Yang M., Peters D., Hoffman R. M., Ruoslahti E., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **103**, 2800–2804 (2006).
- 46) Laakkonen P., Akerman M.E., Biliran H., Yang M., Ferrer F., Karpanen T., Hoffman R. M., Ruoslahti E., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **101**, 9381–9386 (2004).