

35 型アデノウイルスを基本骨格とした新規アデノウイルスベクターの開発

櫻井 文教

Development of a Replication-incompetent Adenovirus Vector Derived from Subgroup B Adenovirus Serotype 35

Fuminori SAKURAI

Laboratory of Gene Transfer and Regulation, National Institute of Biomedical Innovation,
7-6-8, Asagi, Saito, Ibaragi City 567-0085, Japan

(Received July 2, 2008)

Properties of gene delivery vehicles, including gene transfer efficiencies and toxicities, are a key parameter for successful gene therapy. Among various types of gene delivery vehicles that have been developed so far, adenovirus (Ad) vectors have promising potentials as a vector for gene therapy because they can easily be grown to high titers and can efficiently deliver genes to both dividing and non-dividing cells. However, recent studies demonstrated some drawbacks of conventional Ad vectors, which are composed of subgroup C Ad serotype 5 (Ad5). First, Ad5 vectors poorly transduce cells lacking the primary receptor for Ad5, coxsackievirus and adenovirus receptor (CAR). Second, majority of adults have neutralizing antibodies to Ad5. In order to overcome these drawbacks, we developed a novel Ad vector which is fully composed of subgroup B Ad serotype 35 (Ad35). Ad35 vectors can infect a variety of human cells because the primary receptor for Ad35, CD46, is ubiquitously expressed in human cells. Furthermore, Ad35 vectors efficiently transduce in the presence of anti-Ad5 antibodies, and seroprevalence of Ad35 in adults is much lower than that of Ad5. In the current review, I introduce our recent work on development and evaluation of Ad35 vectors, and I also discuss the potential of Ad35 vectors as gene delivery vehicles.

Key words—adenovirus vector; serotype; neutralizing antibody; membrane cofactor protein (CD46); gene delivery

1. はじめに

患者若しくは患者より採取した細胞に遺伝子を導入することにより治療を行う遺伝子治療は、がんや先天性遺伝子疾患をはじめとする各種難治性疾患に対する治療法として期待されており、これまでに1300を超える臨床研究が行われている(2008年3月現在)。これら臨床研究においては、レトロウイルスベクター、アデノウイルス(Ad)ベクター、アデノ随伴ウイルスベクターなど様々なタイプのベクターが用いられているが、中でもAdベクターは全遺伝子治療臨床研究の約25%で用いられているなど、最も期待されるベクターの1つである。一般に汎用されているAdベクターは現在51種類の血清型が同定されているヒトAdのうち(Table. 1),¹⁾

遺伝子の構造解析が最も進んでいる Subgroup C に属する 5 型 Ad (若しくは 2 型) を基本骨格として作製されている。5 型 Ad ベクターは、その優れた遺伝子導入特性から遺伝子治療研究のみならず遺伝子機能解析など基礎研究においても広く用いられているが、近年、研究の進展に伴い 5 型 Ad ベクターが抱える様々な問題点が明らかとなってきた。そこ

Table 1. Human Adenovirus Serotypes

Subgroup	Serotypes	Receptor ^{a)}
A	12, 18, 31	CAR
B1	3, 7, 16, 21, 50	CD46
B2	11, 14, 34, 35	CD46
C	1, 2, 5, 6	CAR
D	8-10, 13, 15, 17, 19, 20, 22-30, 32, 33, 36-39, 42-49, 51	CAR
E	4	CAR
F	40, 41	CAR

CAR: coxsackievirus and adenovirus receptor. ^{a)} Some Ad serotypes recognize other receptors different from CAR and CD46.

独医薬基盤研究所遺伝子導入制御プロジェクト(〒567-0085 茨木市彩都あさぎ7-6-8)

e-mail: sakurai@nibio.go.jp

本総説は、平成20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。

で筆者らはこれらの問題点を克服すべく、Subgroup B に属する 35 型 Ad を基本骨格とした新規 Ad ベクターを開発するとともに、その機能評価を行っている。

2. 従来のアデノウイルスベクターの抱える問題点

Ad は直径約 80 nm の正二十面体構造の内部に直鎖状約 35–36 kb の二本鎖 DNA をゲノムに持つ非エンベロープウイルスであり (Fig. 1), これまでにヒト, チンパンジー, ウシ, ヒツジなどを宿主とする多くの血清型が報告されている。前述したように現在汎用されている Ad ベクターは, 51 種類同定されているヒト Ad のうち 5 型 Ad (若しくは 2 型) を基本骨格としている。5 型 Ad ベクターの特長としては以下のものが挙げられる。1) 種を問わず広範な細胞に遺伝子導入可能であり, 現存のベクターの中では最も高い遺伝子導入活性を示す, 2) 物理化学的に安定であるため濃縮可能である, 3) 非増殖細胞に対しても遺伝子導入可能である, 4) 高タイトーのウイルスが回収可能である (レトロ・レンチ・アデノ随伴ウイルスベクターの 1000 倍以上の収量が得られる), 5) *in vivo* にも適用可能である, 6) 比較的大きな外来遺伝子 (最大 8.1 kb) が搭載可能である, 7) 導入遺伝子が細胞の染色体に組み込まれないため, 遺伝子毒性 (導入遺伝子が染色体に組み込まれることにより細胞ががん化する) を示す可能性が低い。しかし近年の研究の進展に伴い, 以下のような問題点が明らかとなってきた。

1) 第 1 受容体である Coxsackievirus and adenovirus receptor (CAR) の発現の低い細胞には遺伝子導入困難である。

Ad はその正二十面体構造の頂点にペントン (フ

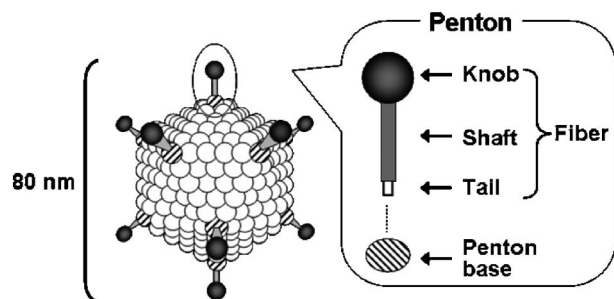


Fig. 1. A Schematic Representation of Adenovirus

アイバー及びペントンベース) と呼ばれる突起構造を有している (Fig. 1)。その感染機構は, まずファイバーの先端領域であるファイバーノブが第 1 受容体である Coxsackievirus and adenovirus receptor (CAR) に結合したのち, ペントンベースの RGD (Arg-Gly-Asp) モチーフが細胞表面のインテグリン ($\alpha_v\beta_3$, $\alpha_v\beta_5$) に結合することにより内在化され, 感染に至る。したがって第 1 受容体である CAR を発現している細胞には極めて効率よく遺伝子導入可能であるものの, CAR の発現量の低い細胞には遺伝子導入困難であることが明らかとなってきた。CAR 陰性細胞は意外にも多く, 遺伝子治療の重要な標的細胞である造血幹細胞をはじめとする血液細胞, 血管平滑筋細胞, 樹状細胞などが CAR 陰性である。またがん細胞においても, がんの悪性度の進行に伴い CAR の発現が低下することが報告されている。したがって CAR 陰性細胞へ遺伝子導入する場合には CAR 以外の受容体を介した遺伝子導入経路が求められる。

2) 既に多くの成人が 5 型 Ad に対する中和抗体を保持している。

Ad は臨床的には咽頭炎, 扁桃炎, 結膜炎などの原因ウイルスであり, ほとんどのヒトが幼児期に感染することにより中和抗体を有しているものと思われる。Seshidhar らの報告によると, 地域にもよるが 50% 以上もの成人は既に 5 型 Ad に対する抗体を保持している。²⁾ 5 型 Ad に対する中和抗体の多くは 5 型 Ad のヘキサソンに結合し, 5 型 Ad ベクターの *in vivo* 遺伝子導入を大きく阻害するとともに, 中和抗体の影響を受け難いことが予想される局所投与においても中和抗体により治療効果が大きく減弱することが報告されている。^{3,4)} さらに抗 5 型 Ad 抗体存在下においては 5 型 Ad ベクターによる組織障害が増強される危険性が指摘されており,⁵⁾ したがって 5 型 Ad ベクターを抗 5 型 Ad 抗体を保持しているヒトに投与した場合には十分な遺伝子発現が得られないだけでなく, 大きな副作用を引き起こす危険性がある。

3. 35 型アデノウイルスの特徴

そこで筆者らは, 5 型 Ad ベクターの長所を生かしつつ上記のような問題点を克服するために, 1) CAR 以外の分子を受容体とし, 2) 抗 5 型 Ad 抗体による阻害を受けず, 3) 抗体保持率の低い血清型

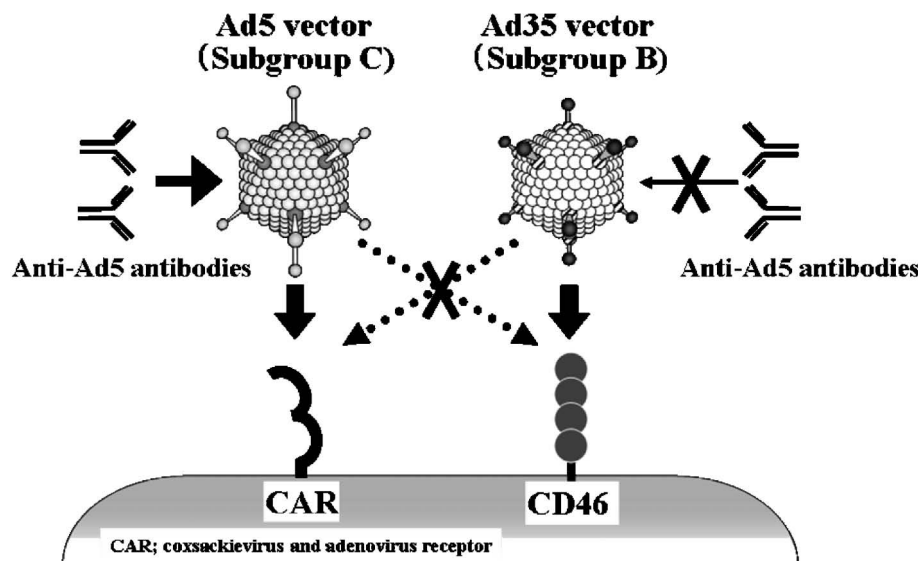


Fig. 2. A Schematic Diagram of Properties of Ad5 and Ad35 Vectors

Subgroup C Ad5 vectors infect cells *via* interaction with CAR (coxsackievirus and adenovirus receptor), on the other hand, subgroup B Ad35 vectors recognize human CD46 as a receptor. Anti-Ad5 antibodies inhibit infection of Ad5 vectors, not Ad35 vectors.

Ad を基本骨格とした新規 Ad ベクターを開発することとした。そのような Ad として着目したのが Subgroup B に属する 35 型 Ad であった。35 型 Ad の特徴としては、以下のものが挙げられる (Fig. 2)。

1) 受容体として CD46 (membrane cofactor protein) に結合し細胞に感染する。

51 種のヒト Ad のうち、Subgroup A, C, D, E, F に属する Ad は CAR を受容体とするが、35 型 Ad をはじめとする Subgroup B に属する Ad は CAR 以外の分子を受容体として認識することが報告されていた。⁶⁾ しかしその受容体は長らく同定されておらず、筆者らが 35 型 Ad ベクター開発に取り組み始めた当初も不明であった。しかしながら、2003 年に補体制御因子である CD46 が 35 型 Ad を含む Subgroup B Ad の受容体であることが報告された。^{7,8)} 詳細は後述するが、CD46 はヒトでは赤血球を除くほぼすべての細胞で発現していることから、35 型 Ad ベクターは CAR 陰性細胞を含め広範の細胞に対し遺伝子導入可能である。

2) 抗 5 型 Ad 抗体による阻害を受けない。

5 型 Ad が subgroup C に属するのに対し、35 型 Ad は subgroup B に属することから 35 型 Ad ベクターは抗 5 型 Ad 抗体による阻害を受けない。したがって、抗 5 型 Ad 抗体を保持しているヒトに対しても 35 型 Ad ベクターは有効であると考えられる。実際に抗 5 型 Ad 血清存在下においても 35 型

Ad ベクターは効率よく遺伝子導入可能であった。

3) 35 型 Ad に対する抗体保持率が低い。

多くの成人が既に抗 5 型 Ad 抗体を保持しているのに対し、Subgroup B Ad に対する抗体保持率は血清型にもよるが全体的に低いことが報告されている。⁹⁾ 特に抗 35 型 Ad 抗体保持率は 20% 以下と低いことから、35 型 Ad ベクターについては既存抗体による影響を受け難いものと思われる。

なお、5 型 Ad 構成タンパク質のうち、ファイバータンパク質だけを 35 型 Ad 由来のものに置換したファイバー置換型 5 型 Ad ベクターも開発されている。^{10,11)} Ad はファイバーノブ領域が受容体に結合することで感染することから、ファイバータンパク質を置換することで感染域を変えることが可能である。しかしファイバー置換型 5 型 Ad ベクターのヘキソン領域は 5 型 Ad 由来のものであり、抗 5 型 Ad 中和抗体の多くはヘキソン領域に結合することから、ファイバー置換型 5 型 Ad ベクターでは抗 5 型 Ad 抗体による遺伝子導入阻害を回避できない。¹²⁾

4. 35 型アデノウイルスベクターの作製

5 型 Ad ベクターは自己複製に必須の遺伝子である E1A 遺伝子 (若しくは E1B を含めた E1 遺伝子) が取り除かれることにより自己複製不能となっており、E1 遺伝子欠損領域に外来遺伝子発現カセットが挿入されている。35 型 Ad も自己複製

不能とするためには、5型 Ad ベクターと同様に E1 領域を取り除くとともに、外来遺伝子発現カセットに置き換える必要がある。筆者らが研究に着手した当初は 35 型 Ad ゲノムの全塩基配列は明らかとなっていなかったが、筆者らは 35 型 Ad ゲノムの制限酵素地図を作製することにより、E1A 遺伝子のすべてと E1B 遺伝子の一部を含む約 2.5 kb を取り除くことに成功するとともに、その領域を外来遺伝子発現カセットに置換した自己複製不能 35 型 Ad ベクターのベクタープラスミドを作製した。¹³⁾

作製したプラスミドを 35 型 Ad ゲノムの両末端に存在する制限酵素サイトで切断したのち、5 型 Ad の E4 タンパク質、若しくは 35 型 Ad の E1B55K タンパク質発現 293 細胞に Transfection することにより 35 型 Ad ベクターを回収した (293 細胞は 5 型 Ad の E1 タンパク質を恒常的に発現している)。なお通常の 293 細胞を用いた場合には 35 型 Ad ベクターを回収できなかった。通常の 293 細胞で 35 型 Ad ベクターの回収ができずに、上記の細胞では回収可能であることの原因については明らかとなっていない。しかし E4 タンパク質は E1B55K タンパク質と複合体を形成しウイルス

RNA の細胞質輸送に関与することが報告されていることから、恐らく Ad ベクターが増幅するためには E4 タンパク質と E1B55K タンパク質が複合体を形成する必要がある、そのためには E1B55K タンパク質と E4 タンパク質が同じ血清型由来でなければならないのであろう。またこれらのパッケージング細胞では、パッケージング細胞に挿入されたウイルス由来の遺伝子配列と 35 型 Ad ベクターゲノムとの間に相同な遺伝子配列が存在しない。したがって、293 細胞を用いた 5 型 Ad ベクター増幅では大きな問題となっている相同組換えによる野生型ウイルス (Replication-competent adenovirus; RCA) の出現が上記パッケージング細胞を用いた 35 型 Ad ベクター作製では理論上起こり得ないため安全性が高いと考えられる。この点も本ベクター系の大きな特長の 1 つである。

さらに筆者らは、水口らによって開発された最も簡便な 5 型 Ad ベクター作製法として汎用されている *in vitro* ligation 法^{14,15)} を 35 型 Ad ベクター作製にも適用することで、35 型 Ad ベクターを簡便に効率よく作製する方法の開発にも成功した (Fig. 3).¹⁶⁾ これにより 35 型 Ad ベクターも 5 型 Ad ベク

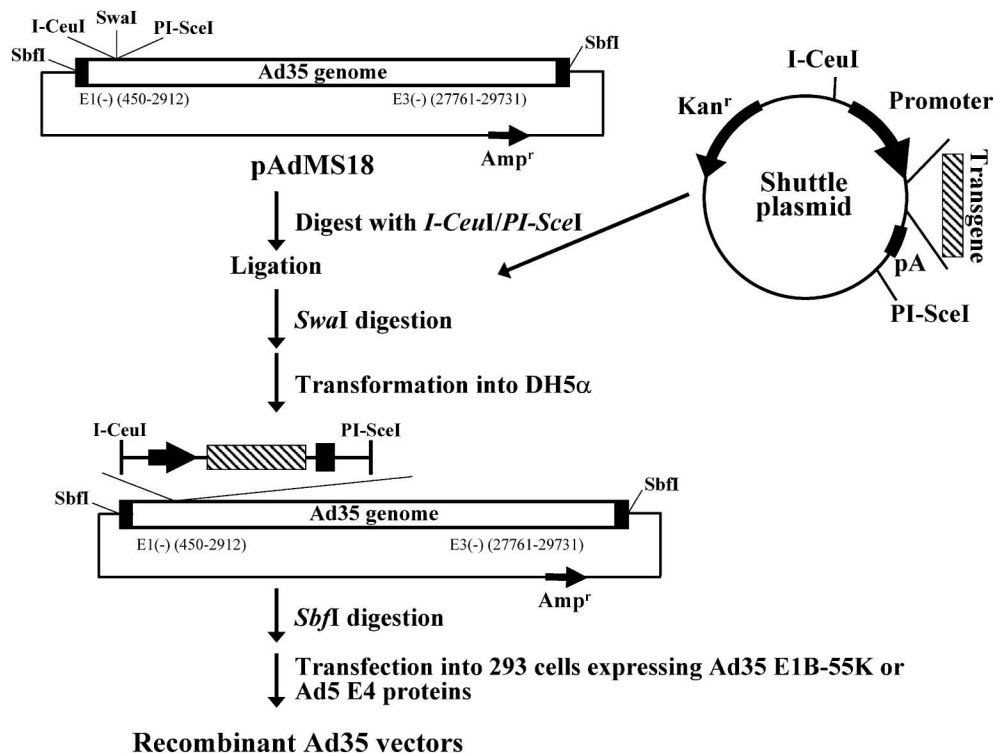


Fig. 3. Construction of Replication-incompetent Ad35 Vectors by an Improved *In vitro* Ligation Method, which was Originally Developed by Mizuguchi and Kay^{14,15)}

ター同様、簡便にベクターを作製することが可能になった。

5. 35 型アデノウイルスベクターの *In vitro* 遺伝子導入特性

先述したように、35 型 Ad ベクターは CD46 に結合し細胞に感染する。CD46 は分子量約 55-65 KDa の糖タンパク質で、本来補体成分である C3b や C4b を分解することにより、自己の細胞を補体による攻撃から守る役割を担っている。4 つの Short consensus repeat (SCR), transmembrane domain, cytoplasmic tail などから構成されており (Fig. 4), Subgroup B Ad のみならず、麻疹ウイルス (一部の strain), ヒトヘルペスウイルス type 6, Nesseria などの感染受容体としても知られている。さらに最も大きな特徴として CAR とは異なり、CD46 はヒトでは赤血球を除くほぼすべての細胞において発現している。筆者らが 35 型 Ad ベクターを血液細胞を含むヒト由来各種培養細胞に対し作用させたところ、ほぼすべての細胞に対し高い遺伝子導入効率を示した (Fig. 5).¹⁷⁾ これはヒト CD46 の広範な発現を反映したものであると思われる。

また筆者らは 35 型 Ad のウイルスとしての基本特性を明らかにすることが 35 型 Ad ベクターの遺伝子導入特性の解明につながると考え、35 型 Ad の感染機構の解明にも取り組んでいる。まず 4 つの SCR をそれぞれ欠損させた変異型 CD46 発現細胞及び抗 CD46 抗体を用いて CD46 の 35 型 Ad 結合部位の同定を試みたところ、35 型 Ad は CD46 の SCR1 及び 2 に結合することが判明した (Fig. 6).¹⁸⁾ さらに 35 型 Ad も 5 型 Ad と同様にペントンペー

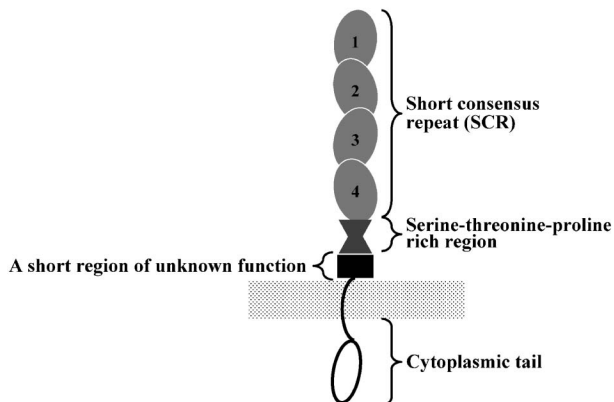
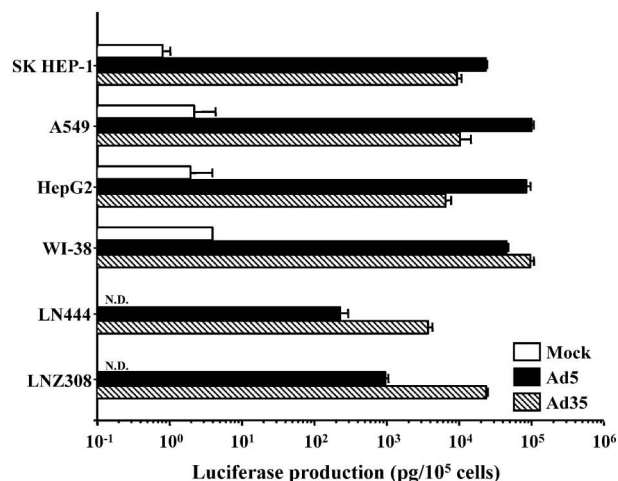
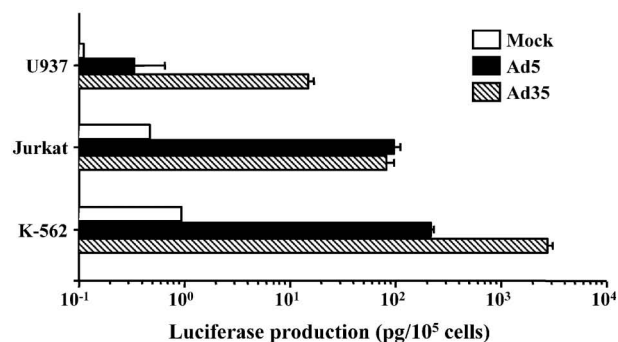


Fig. 4. A Schematic Diagram of Human CD46

スにインテグリンに親和性を有する RGD 配列を有することから、35 型 Ad の血液細胞への感染における RGD 配列の関与について検討した。その結果、ペントンベース RGD 配列は 35 型 Ad ベクターの血液細胞への感染に重要であり、特に細胞内在化後の過程に重要であることが示された。¹⁹⁾ また CD46 は CD46 を受容体とする麻疹ウイルスやヒトヘルペスウイルス type 6 が感染するとその細胞表面発現量が大きく減少することが知られている。²⁰⁻²²⁾ そこで 35 型 Ad 感染後の CD46 細胞表面発現量を測定したところ、35 型 Ad もヒト末梢血単核球細胞並びに白血病細胞株において感染により CD46 細胞表面発現量を大きく減少させることが明らかとなった (Fig. 7).²³⁾ CD46 は自己の細胞を補



A



B

Fig. 5. *In vitro* Transduction Efficiencies of Ad5 and Ad35 Vectors in Various Types of Human Cells

Adherent cells (A) and blood cells (B) were transduced with Ad5 and Ad35 vectors expressing firefly luciferase at 3000 vector particle (VP)/cell for 1.5 h. Following a 48 h-incubation, the luciferase productions were measured by chemiluminescence assay. The data are expressed as mean ± S.D. (n = 4). N.D.: not detected (under the limit of detection).

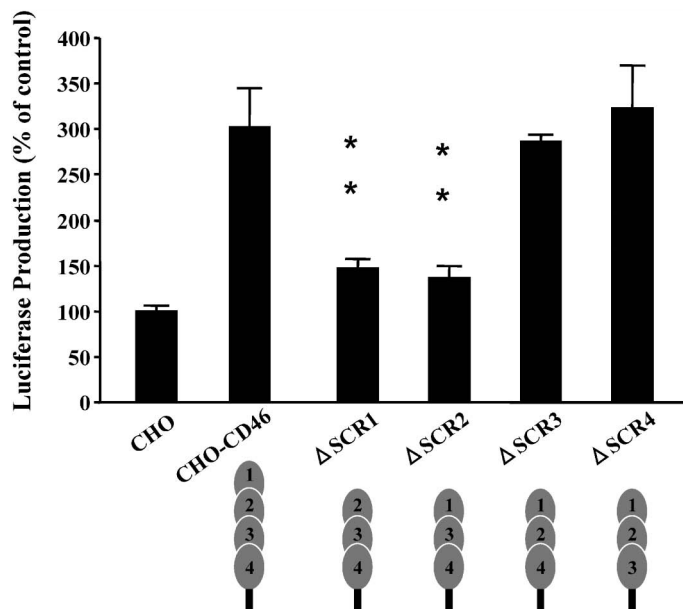


Fig. 6. Transduction Efficiencies of Ad35 Vectors in CHO Cells Expressing the CD46 Mutants

The cells were transduced with Ad35 vectors expressing firefly luciferase at 3000 VP/cell for 1.5 h. Following a 48 h-incubation, the luciferase productions in the cells were measured by chemiluminescence assay. The data was normalized to the luciferase production in parental CHO cells.

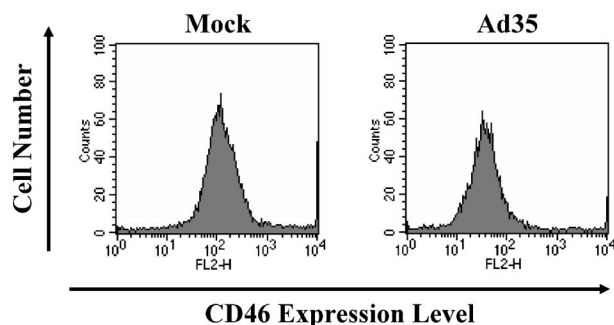


Fig. 7. Downregulation of CD46 from the Cell Surface of Human Peripheral Blood Cells after Infection of Ad35 Vectors

Human peripheral blood cells were incubated with Ad35 vectors at 10000 VP/cell for 48 h. Cells were harvested and stained with anti-human CD46 antibody after fixation. The expression levels of CD46 on the cell surface were determined by flowcytometry.

体系による攻撃から守る働きを担っていることから、CD46 発現量減少は細胞が補体系による攻撃を受け易くなる可能性を示唆しており注意が必要である。

6. 35 型アデノウイルスベクターの *In vivo* 遺伝子導入特性

一方で、35 型 Ad ベクターを CHO 細胞や B16 細胞などげっ歯類由来の細胞に作用させたところ、その遺伝子発現効率は極めて低いものであった。さらに、5 型 Ad ベクターをマウス尾静脈より全身投

与すると全臓器、特に肝臓において高い遺伝子発現量を示すのに対し、35 型 Ad ベクターによる各臓器における遺伝子発現量は臓器にもよるが 5 型 Ad ベクターと比較し 1-4 オーダー低いものであった。¹⁷⁾ これはげっ歯類では CD46 が精巣でしか発現していないことに加え、げっ歯類の CD46 はヒト CD46 と相同性が低く、35 型 Ad が結合できないことによるものと思われた。²⁴⁾

そこで筆者らはヒトと同様にヒト CD46 をほぼ全臓器で発現している動物を用いて 35 型 Ad ベクターの特性を評価することが必要と考え、ヒト CD46 トランスジェニック (CD46TG) マウス (大阪大学・岡部 勝先生より供与) を用いて 35 型 Ad ベクターの遺伝子導入特性を検討した。²⁵⁾ 本マウスにはヒト CD46 発現単位が BAC (bacterial artificial chromosome) を用いて挿入されており、ヒトとほぼ同様の CD46 発現パターンを示すことを確認している。野生型及び CD46TG マウスに 35 型 Ad ベクターを静脈内及び腹腔内投与したところ、両投与経路ともに CD46TG マウスにおいて野生型マウスよりも有意に高い遺伝子発現を示した (Fig. 8)。例えば相同染色体の両方に CD46 遺伝子を有したホモマウスに 35 型 Ad ベクターを静脈内投与した場合の肝臓での遺伝子発現効率は、野生型マウス

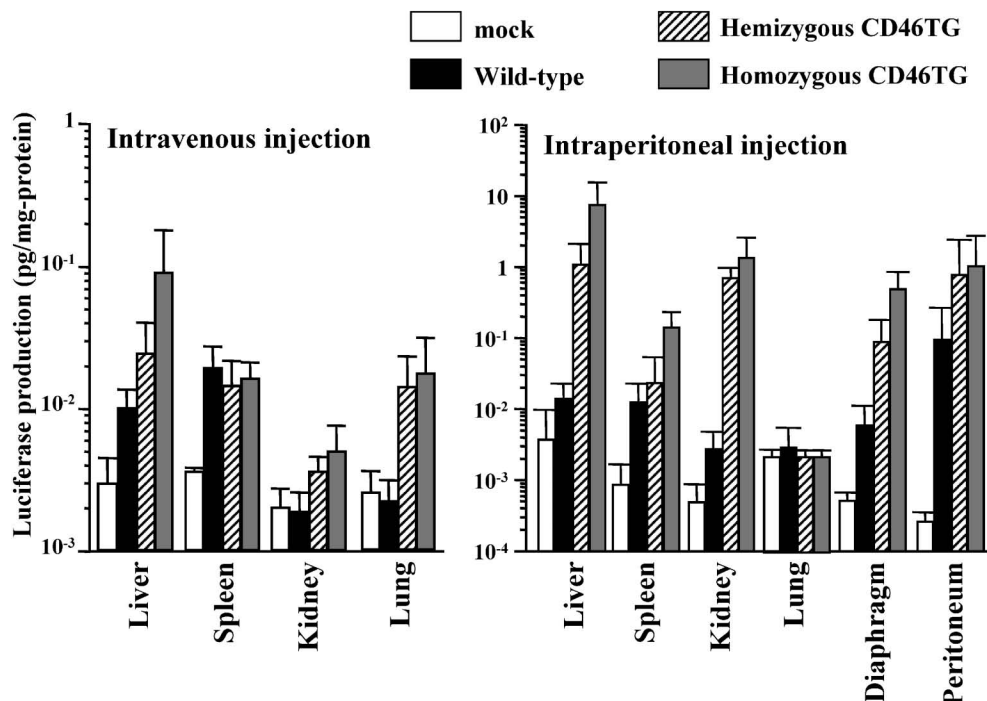


Fig. 8. Firefly Luciferase Production in CD46TG and Wild-type Mice following Intravenous and Intraperitoneal Injection of Ad35 Vectors

Firefly luciferase-expressing Ad35 vectors were intravenously or intraperitoneally injected at the dose of 1.5×10^{10} VP/mouse. Forty-eight hours later, the organs were collected, and luciferase production was measured using a chemiluminescent assay. All data represent the mean \pm S.D. of 4–6 mice.

の約 10 倍高いものであった。しかしながら CD46TG マウスにおける 35 型 Ad ベクターの遺伝子発現効率は 5 型 Ad ベクターのものと比較すると依然低く、期待するような劇的な遺伝子発現効率の改善はみられなかった。例えば 35 型 Ad ベクターをホモマウスに静脈内投与したときの肝臓及び脾臓での遺伝子発現量は、5 型 Ad ベクターを野生型マウスに静脈内投与した場合と比較し、それぞれ約 1/20000、及び 1/50 であった。さらに 35 型 Ad ベクターを CD46TG マウスに腹腔内投与した場合には静脈内投与よりも高い遺伝子発現を示したものの、遺伝子発現を示した細胞は臓器表面の中皮細胞であった。

CD46TG マウスにおいても 35 型 Ad ベクターの遺伝子発現効率に大きな改善がみられない原因は不明であるが、原因の 1 つとして CD46 が主に細胞の Basolateral 側で発現しているために、²⁶⁾ 細胞外マトリックスやタイトジャンクションなどの立体障害により 35 型 Ad ベクターが CD46 に到達できないのではないかと推察された。又は 35 型 Ad の受容体として CD46 以外の未知の受容体の存在が示唆され

ているが、²⁷⁾ マウスにはその受容体が発現していないことが考えられた。そこで筆者らはヒトと同様に生来より CD46 を全身で発現している霊長類を用いて 35 型 Ad ベクターの遺伝子導入特性を検討することが必要と考え、カニクイザルを用いて遺伝子導入実験を行った。²⁸⁾ カニクイザルの CD46 はヒト CD46 と相溶性が高く、²⁹⁾ カニクイザル培養細胞に対し 35 型 Ad ベクターが効率よく遺伝子導入可能であることを確認している。35 型 Ad ベクターをカニクイザルに静脈内投与し投与 96 時間後の各臓器における遺伝子発現並びにベクター集積量を測定したところ、35 型 Ad ベクターは主に肝臓や脾臓に高い集積を示したものの、各臓器における遺伝子発現はほとんど観察されなかった (Fig. 9)。しかし一方で Ad ベクターによる肝障害 (アポトーシス) を TUNEL assay を用いて検討したところ、5 型 Ad ベクター投与群では多くのアポトーシス細胞が検出されたのに対し、35 型 Ad ベクター投与群ではほとんど観察されなかった (Fig. 10)。さらに血清中の組織障害性マーカー並びに組織切片の病理解析の結果、炎症反応を含む 35 型 Ad ベクターによ

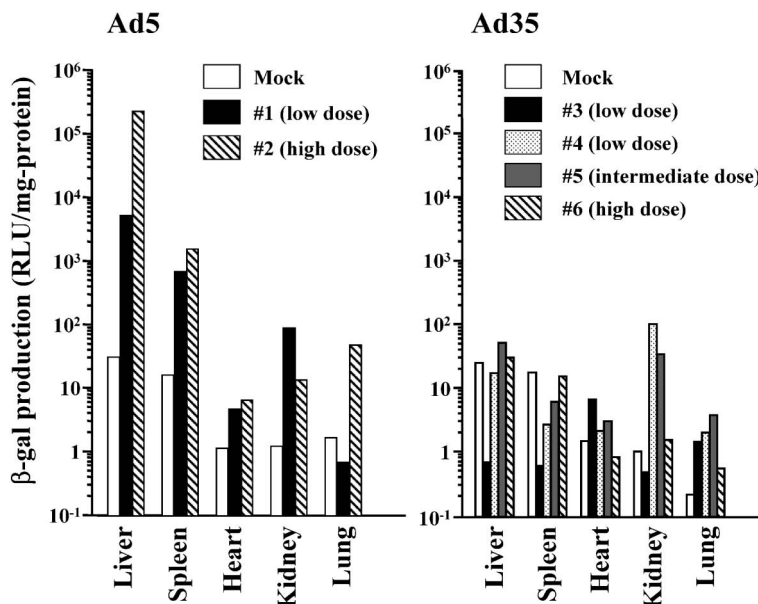


Fig. 9. β -Galactosidase Production in Cynomolgus Monkeys following Intravenous Injection of Ad35 Vectors.

β -Galactosidase-expressing Ad5 and Ad35 vectors were intravenously injected at the dose of 0.4×10^{12} (low dose), 1×10^{12} (intermediate dose), or 2×10^{12} (high dose) VP/kg. Four days after injection, the organs were collected, and β -galactosidase production in the organs was measured using a chemiluminescent assay.

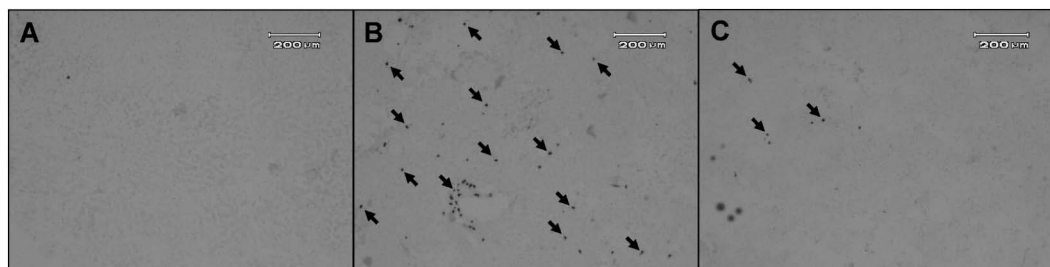


Fig. 10. Ad Vector-induced Apoptosis in the Liver of Cynomolgus Monkeys

β -Galactosidase-expressing Ad5 and Ad35 vectors were intravenously injected at the dose of 2×10^{12} VP/kg. Four days after injection, the livers were collected, and apoptotic cells in the liver sections were analyzed by the TUNEL apoptosis assay. Arrows indicate apoptotic cells.

る組織障害は5型Adベクターと比較すると総じて低い傾向が観察され、35型Adベクターの高い安全性が示唆された。

カニクイザルへの静脈内投与による遺伝子導入実験では、35型Adベクターによる遺伝子発現はほとんど観察されなかったものの、本実験結果は新たな35型Adベクターの有用性を示唆するものであった。すなわち、35型Adベクターは血管側から各臓器に遺伝子導入困難であることから、35型Adベクターを局所投与した場合、投与部位で効率よく遺伝子発現するとともに、たとえ投与部位より全身循環に漏れ出たとしても投与部位以外で遺伝子発現を示す可能性は極めて低いと考えられる。つまり、

標的臓器以外での遺伝子発現による副作用は極めて低いものと予想される。そこで35型Adベクターをカニクイザル臓器局所に直接投与し、各臓器における遺伝子発現を検討した。その結果、35型Adベクターは投与部位周辺に局限した遺伝子発現を示すと同時に、一部は全身循環へ漏出したものの、35型Adベクターを投与していない臓器では遺伝子発現は観察されなかった。以上の結果より、35型Adベクターは局所投与による遺伝子導入において安全性が高く有用なベクターであることが示唆された。

7. ヒト造血幹細胞への遺伝子導入

造血幹細胞は、その多分化能・自己複製能から遺伝子治療の重要な標的細胞であるだけでなく、再生

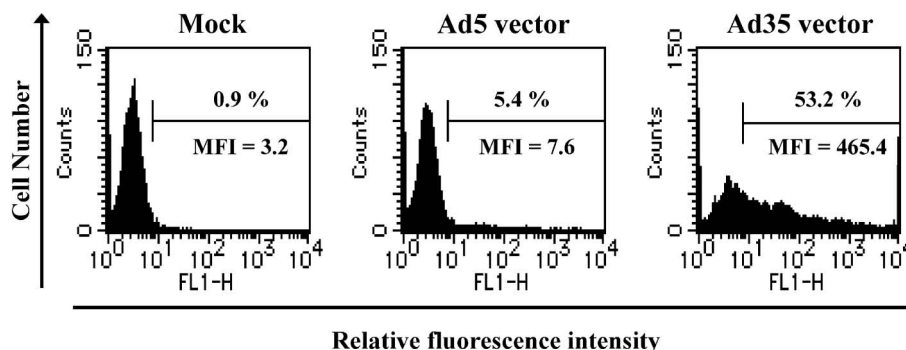


Fig. 11. Transduction Efficiencies of Ad5 and Ad35 Vectors in Human Bone Marrow-derived CD34⁺ Cells

The human CD34⁺ cells were suspended in the medium containing the cytokine cocktail. The cells were infected with Ad5 or Ad35 vectors expressing enhanced green fluorescence protein (GFP) at 300 plaque forming unit (PFU)/cell 16–18 h after seeding. The culture medium was added 1.5 h after transduction. Following a 48 h-incubation, the cells were recovered and subjected to flow cytometric analysis.

医療・細胞治療における細胞ソースとして注目を集めている。したがって造血幹細胞への高効率な遺伝子導入ベクターの開発は極めて重要な課題であるが、ヒト造血幹細胞を含む画分であるヒト骨髄由来CD34陽性細胞ではCARの発現が極めて低いため、³⁰⁾ 5型Adベクターでは十分な遺伝子発現が得られない。一方、35型Adは以前より血液細胞に対し高い親和性を有することが知られていた。³¹⁾ そこで筆者らは35型Adベクターを用いてヒト骨髄由来CD34陽性細胞への遺伝子導入を試みたところ、35型Adベクターは5型Adベクターと比較し極めて効率よくCD34陽性細胞に遺伝子導入可能であった (Fig. 11).¹³⁾ さらに35型AdベクターはCD34陽性細胞の中でもさらに未分化な画分であるCD34陽性CD38陰性細胞及びCD34陽性AC133陽性細胞にも効率よく遺伝子導入可能であった。またColony-forming assayにおいて遺伝子発現細胞は未処理細胞群と同程度のコロニーを形成したことから、35型Adベクターによる遺伝子発現細胞は分化能・増殖能を保持していることが示された。¹⁶⁾ よって35型Adベクターは自己増殖関連遺伝子導入による造血幹細胞増幅など、一過性の遺伝子発現が望ましい場合においては造血幹細胞への極めて有用な遺伝子導入ベクターになるものと期待される。現在筆者らはCD34陽性細胞に機能遺伝子を導入することにより特定の細胞への分化誘導並びに自己複製促進に向けた研究を進めている。

8. おわりに

以上、本稿では筆者らが行った35型Adベクターの開発及び機能評価に関する研究について紹介

した。遺伝子導入ベクターは遺伝子治療の成否を決める重要な要因であり、これまでに様々なタイプの遺伝子導入ベクターが開発されてきた。しかしながら1989年に米国において世界で最初の遺伝子治療が行われてから15年以上が経過したものの、明確な治療効果が得られた例が少ないことを鑑みると、既存の遺伝子導入ベクターは求められる機能を十分に満たしていないと思われる。今一度遺伝子導入ベクターというものを眺めてみると、ウイルス・非ウイルスベクターを問わず遺伝子導入ベクターはまさしく「遺伝子」という「薬」を運ぶ「薬剤」であるとともに、その開発・改良にはウイルス学・遺伝子工学・薬物動態学など多分野の集約を要する。したがって今後、より多分野の研究者が遺伝子導入ベクターの開発研究に参入し力を合わせることで、わが国の遺伝子治療研究が大きく前進することが期待されるとともに、本研究がわが国におけるベクター開発及び遺伝子治療研究に少しでも貢献できることを期待する次第である。

謝辞 本研究を遂行するに当たり、終始御指導を賜りました獨医薬基盤研究所遺伝子導入制御プロジェクト水口裕之プロジェクトリーダー、獨医薬品医療機器総合機構早川堯夫顧問、国立医薬品食品衛生研究所生物薬品部山口照英部長に深謝いたします。また本研究は獨医薬基盤研究所、国立医薬品食品衛生研究所遺伝子細胞医薬部及び生物薬品部において行われたものであり、多くの共同研究者をはじめとします実験に協力して頂いた関係者の皆様に心より感謝いたします。

REFERENCES

- 1) Havenga M. J., Lemckert A. A., Ophorst O. J., van Meijer M., Germeraad W. T., Grimbergen, J., van Den Doel M. A., Vogels R., van Deutekom J., Janson A. A., de Bruijin J. D., Uytdehaag F., Quax P. H., Logtenberg T., Mehtali M., Bout A., *J. Virol.*, **76**, 4612–4620 (2002).
- 2) Seshidhar Reddy P., Ganesh S., Limbach M. P., Brann T., Pinkstaff A., Kaloss M., Kaloss M., Kaleko M., Connelly S., *Virology*, **311**, 384–393 (2003).
- 3) Nanda A., Lynch D. M., Goudsmit J., Lemckert A. A., Ewald B. A., Sumida S. M., Truitt D. M., Abbink P., Kishko M. G., Gorgone D. A., Lifton M. A., Shen L., Carville A., Mansfield K. G., Havenga M. J., Barouch D. H., *J. Virol.*, **79**, 14161–14168 (2005).
- 4) Lemckert A. A., Sumida S. M., Holterman L., Vogels R., Truitt D. M., Lynch D. M., Nanda A., Ewald B. A., Gorgone D. A., Lifton M. A., Goudsmit J., Havenga M. J., Barouch D. H., *J. Virol.*, **79**, 9694–9701 (2005).
- 5) Vlachaki M. T., Hernandez-Garcia A., Ittmann M., Chhikara M., Aguilar L. K., Zhu X., Teh B. S., Butler E. B., Woo S., Thompson T. C., Barrera-Saldana H., Aguilar-Cordova E., *Mol. Ther.*, **6**, 342–348 (2002).
- 6) Roelvink P. W., Lizonova A., Lee J. G., Li Y., Bergelson J. M., Finberg R. W., Brough D. E., Kovesdi I., Wickham T. J., *J. Virol.*, **72**, 7909–7915 (1998).
- 7) Gaggar A., Shayakhmetov D. M., Lieber, A., *Nat. Med.*, **9**, 1408–1412 (2003).
- 8) Segerman A., Atkinson J. P., Marttila M., Dennerquist V., Wadell G., Arnberg N., *J. Virol.*, **77**, 9183–9191 (2003).
- 9) Vogels R., Zuijdsgeest D., van Rijnsoever R., Hartkoorn E., Damen I., de Bethune M. P., Kostense S., Penders G., Helmus N., Koudstaal W., Cecchini M., Wetterwald A., Sprangers M., Lemckert A., Ophorst O., Koel B., van Meerendonk M., Quax P., Panitti L., Grimbergen J., Bout A., Goudsmit J., Havenga M., *J. Virol.*, **77**, 8263–8271 (2003).
- 10) Mizuguchi H., Hayakawa T., *Gene*, **285**, 69–77 (2002).
- 11) Shayakhmetov D. M., Papayannopoulou T., Stamatoyannopoulos G., Lieber A., *J. Virol.*, **74**, 2567–2583 (2000).
- 12) Sumida S. M., Truitt D. M., Lemckert A. A., Vogels R., Custers J. H., Addo M. M., Lockman S., Peter T., Peyerl F. W., Kishiko M. G., Jackson S. S., Gorgone D. A., Lifton M. A., Essex M., Walker B. D., Goudsmit J., Havenga M. J., Barouch D. H., *J. Immunol.*, **174**, 7179–7185 (2005).
- 13) Sakurai F., Mizuguchi H., and Hayakawa T., *Gene Ther.*, **10**, 1041–1048 (2003).
- 14) Mizuguchi H., Kay M. A., *Hum. Gene Ther.*, **9**, 2577–2583 (1998).
- 15) Mizuguchi H., Kay M. A., *Hum. Gene Ther.*, **10**, 2013–2017 (1999).
- 16) Sakurai F., Kawabata K., Yamaguchi T., Hayakawa T., Mizuguchi H., *Gene Ther.*, **12**, 1424–1433.
- 17) Sakurai F., Mizuguchi H., Yamaguchi T., Hayakawa T., *Mol. Ther.*, **8**, 813–821 (2003).
- 18) Sakurai F., Murakami S., Kawabata K., Okada N., Yamamoto A., Seya T., Hayakawa T., Mizuguchi H., *J. Control. Release*, **113**, 271–278 (2006).
- 19) Murakami S., Sakurai F., Kawabata K., Okada N., Fujita T., Yamamoto A., Hayakawa T., Mizuguchi H., *Gene Ther.*, **14**, 1525–1533 (2007).
- 20) Santoro F., Kennedy P. E., Locatelli G., Malnati M. S., Berger E. A., Lusso P., *Cell*, **99**: 817–827 (1999).
- 21) Naniche D., Wild T. F., Roubourdin-Combe C., Gerlier D., *J. Gen. Virol.*, **74** (Pt 6), 1073–1079 (1993).
- 22) Gill D. B., Koomey M., Cannon J. G., Atkinson J. P., *J. Exp. Med.*, **198**, 1313–1322 (2003).
- 23) Sakurai F., Akitomo K., Kawabata K., Hayakawa T., Mizuguchi H., *Gene Ther.*, **14**, 912–919 (2007).
- 24) Tsujimura A., Shida K., Kitamura M., Nomura M., Takeda J., Tanaka H., Matsumoto M., Matsumiya K., Okuyama A., Nishimune Y., Okabe M., Seya T., *Biochem. J.*, **330** (Pt 1), 163–168 (1998).
- 25) Sakurai F., Kawabata K., Koizumi N., Inoue N., Okabe M., Yamaguchi T., Hayakawa T.,

- Mizuguchi H., *Gene Ther.*, **13**, 1118–1126 (2006).
- 26) Maisner A., Zimmer G., Liszewski M. K., Lublin D. M., Atkinson J. P., Herrler G., *J. Biol. Chem.*, **272**, 20793–20799 (1997).
- 27) Segerman A., Arnberg N., Erikson A., Lindman K., Wadell G., *J. Virol.*, **77**, 1157–1162 (2003).
- 28) Sakurai F., Nakamura S., Akitomo K., Shibata H., Terao K., Kawabata K., Hayakawa T., Mizuguchi H., *Mol. Ther.*, **16**, 726–733 (2008).
- 29) Hsu E. C., Sabatino S., Hoedemaeker F. J., Rose D. R., Richardson C. D., *Virology*, **258**, 314–326 (1999).
- 30) Rebel V. I., Hartnett S., Denham J., Chan M., Finberg R., Sieff C. A., *Stem Cells*, **18**, 176–182 (2000).
- 31) Segerman A., Mei Y. F., Wadell, G., *J. Virol.*, **74**, 1457–67 (2000).