

次世代遺伝子治療用ベクターシステムの開発

- ウイルスベクターの DDS -

国立医薬品食品衛生研究所
遺伝子細胞医薬部
水口裕之

1. はじめに

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、安全性が高く、機能面で優れた次世代遺伝子治療用ベクターの開発、及び関連する遺伝子導入・発現技術に関する基盤技術を開発することである。治療用遺伝子を搭載した遺伝子治療用ベクターは未来型の“薬”と捉えることができ、“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。“遺伝子治療薬”の開発が既存の医薬品と大きく異なる点は、既存の医薬品では主剤の物性等により剤型の開発法は様々であるが、“遺伝子治療薬”の場合は、主剤となる核酸は物性的には均一であり、それ故剤型（ベクターに相当する）の開発方法は主剤によらず同一であるという点である。即ち、開発に関わる過程・行程が極めて明確な医薬品であるといえる。また、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、主剤となるべき治療用遺伝子の候補は急速に増加することが予想される。本講演では、遺伝子工学的技術を用いることによりウイルスベクター、特にアデノウイルスベクターにおける剤型（ベクター）を最適化するための方法論を紹介する。このような改良型ベクターは、“遺伝子治療薬”における基本剤型となるだけでなく、新規遺伝子の機能解明、即ち新たな主剤（治療用遺伝子）の発掘にも大きく貢献できる。

2. アデノウイルスベクターの性質

ヒトアデノウイルスは、現在までに約 50 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。ウイルスゲノムは約 36kb の線状二本鎖 DNA からなり、初期遺伝子（主にウイルス DNA の複製に関与）の E1・E2・E3・E4 と、後期遺伝子（主にカプシドなどの構造タンパク質の合成に関与）の L1・L2・L3・L4・L5 に大別される（図 1）。ウイルスは 252 個のカプソメアよりなる正 20 面体構造をしており、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、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(v 3、 v 5)と結合することによって起こる。

アデノウイルスベクターは、1)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効率の良いもののひとつであること、2)増殖停止期の細胞に対しても効率良く遺伝子導入ができること、3)in vivo への遺伝子導入に適していること、4)遠心により濃縮が可能であり、高タイターのウイルスが得られることなど、ベクターの基本的性質として多くの利点を有している。我々は、in vitro ライゲーションに基づいたプラスミド構築を利用することで極めて効率良く簡便にアデノウイルスベクターを作製できる技術(キット化済み)を開発しており(1,2)、本技術をベースにして従来のアデノウイルスベクターの欠点を補い、更なる機能を付与することで、安全性・有効性に優れた次世代アデノウイルスベクターの開発を進めている。

3. 標的細胞親和性を制御できるファイバー改変アデノウイルスベクター

前述したように、アデノウイルスベクターの感染には細胞表面上の CAR の発現が必要であり、CAR の発現が乏しい細胞(気道上皮細胞、平滑筋細胞、骨格筋細胞、造血幹細胞をはじめとする血球系の細胞、樹状細胞、一部の癌細胞など)への遺伝子導入効率は極めて悪いことが知られている。また、CAR の発現は多くの種類の細胞で認められるため、ベクターの感染域に組織特異性がなく、全身投与した場合、多くの細胞・組織に非特異的に移行することが問題となっている。そこで、ウイルス表面のファイバータンパク質に外来ペプチドを発現させることによりベクターの標的細胞選択性を制御し、より広範な目的に使用できるファイバーミュータントアデノウイルスベクターの開発を行った(図1)。即ち、ファイバーノブの HI loop 領域に v インテグリンに高親和性を示す RGD 配列を挿入したベクターや、ファイバーノブの C 末端領域にヘパラン硫酸に親和性を示す K7 (KKKKKKK)配列を挿入したベクターを遺伝子工学的技術を利用して作製した。各種細胞への遺伝子導入実験を行ったところ、これらのファイバーミュータントアデノウイルスベクターは CAR の発現が乏しい細胞に対しても極めて高い遺伝子導入効率を示した(図B)1(3)。また、ファイバー部位を CAR 以外の分子を認識して感染することが知られている 35 型アデノウイルスのファイバーと置換することで(ファイバー以外のベクターバックボーンは 5 型アデノウイルスからなる)、より広い感染域をもったベクターを開発した(図1C)(4)。これらの各種ベクターをターゲット組織・細胞の性質に合わせて使い併せることで、アデノウイルスベクターのより広範な利用が可能となった。また、標的細胞に対する親和性を高めたファイバー改変アデノウイルスベクターは、in vivo への適用に関して、遺伝子導入効率を改善しベクター投与量を下げることが可能となり、有効性の向上と共に、副作用の軽減も期待できることが明らかになった(5)。

一方、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の基盤技術として、ファイバーやペントンベースに変異を導入することにより、native の受容体であ

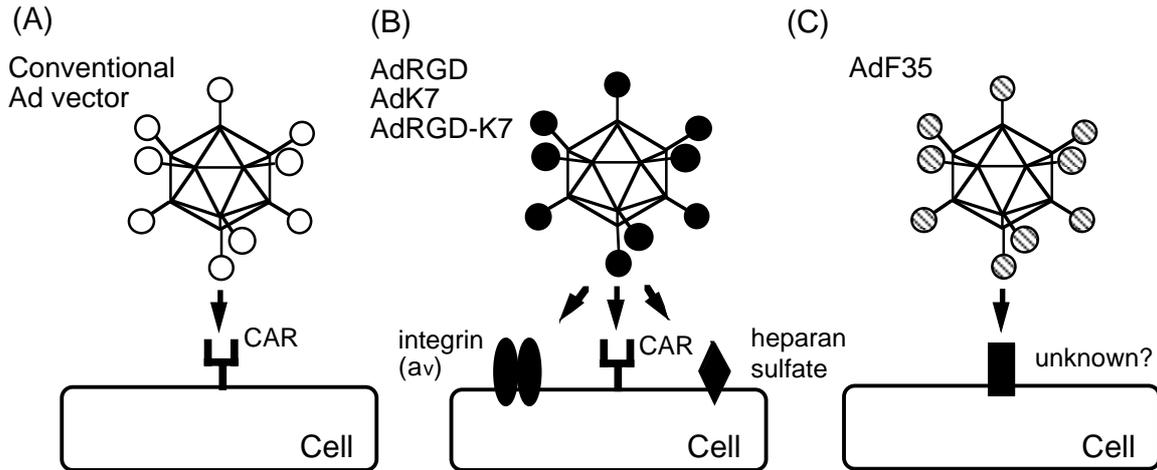


図1. ファイバー改変アデノウイルスベクターによる遺伝子導入

- (A) 従来型アデノウイルスベクター
- (B) RGDペプチドやポリリジンペプチドをファイバーに付与したアデノウイルスベクター
- (C) ファイバーを35型アデノウイルスのものに置換したアデノウイルスベクター

る CAR や α_v インテグリンを認識しないベクターシステムを開発した(6)。現在、このようなベクターをベースにして、組織特異的に遺伝子導入可能なアデノウイルスベクターの開発を進めている。

4. 発現制御型アデノウイルスベクター

外来遺伝子の発現レベルを調節できるベクターの開発は、遺伝子治療の有効性や安全性の向上に必要である。我々は遺伝子発現系としては最も汎用されているテトラサイクリンの遺伝子発現制御系を搭載させたベクター開発を進めている。テトラサイクリンの遺伝子発現制御系は合成転写活性化因子の tTA (tetracycline-controlled transcriptional activator) や rtTA (reverse tetracycline-controlled transcriptional activator) を発現するユニットと、テトラサイクリン誘導性のプロモーター制御下に目的遺伝子を発現するユニットからなる。そこで我々は、E1 欠損領域だけでなく E3 欠損領域にも同時に外来遺伝子を挿入できるシステムを開発し、単一のベクターで目的遺伝子の発現制御が可能なアデノウイルスベクターを開発した。即ち、E1 欠損領域に目的遺伝子、E3 欠損領域に tTA 遺伝子を挿入することで tet-off システムを搭載したアデノウイルスベクター、あるいは E3 欠損領域に rtTA を挿入することで tet-on システムを搭載したアデノウイルスベクターを作製した(図2 A,B) (7,8)。

これらのベクターの機能を培養細胞、マウスを用いて検討したところ、tet-off システム搭載アデノウイルスベクターは優れた発現誘導能を示したが、tet-on システムによる発現誘導能は低く、改良が必要と考えられた。そこで、テトラサイクリン誘導性の転写サイレンサーである tTS (tetracycline-controlled transcriptional silencer) 遺伝子を E4 領域と 3'ITR 配列の間の部位に挿入したトリプル遺伝子発現系からなるアデノウイルス

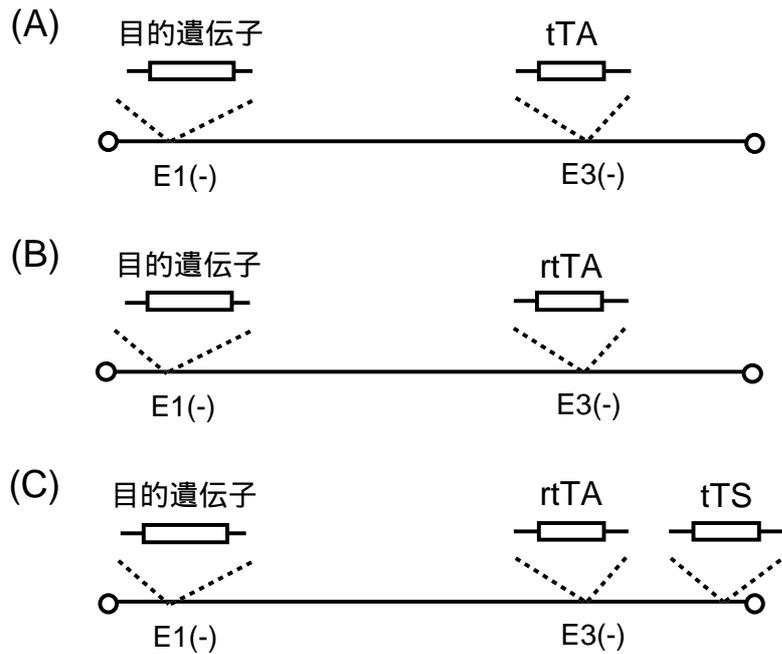


図 2 . 発現制御型アデノウイルスベクターの構造
 (A) tet-off 発現制御型アデノウイルスベクター
 (B) tet-on 発現制御型アデノウイルスベクター
 (C) 改良型 tet-on 発現制御型アデノウイルスベクター

ベクターを作製したところ、tet-on システムにおいても高い発現誘導能を得ることが可能となった (図 2 C)。従って、外的に加えた薬剤によって、目的遺伝子の発現を正あるいは負の両方向に極めて効率良く制御できるベクターの開発に成功した。

5 . おわりに

アデノウイルスベクターは遺伝子治療用ベクターとして有用であるばかりでなく、新規遺伝子の機能解析を目的とした研究に必須の極めて優れた基本的技術でもある。また、創薬ターゲット分子の探索という観点からは、ゲノム情報、トランスクリプトーム解析等により疾患関連遺伝子などの候補遺伝子 (群) の絞り込みが行われるが、最終的には候補遺伝子 (群) を目的細胞・組織に導入し、その機能を直接評価する実証的解析が必要となる。本過程において、様々な機能を付与した次世代アデノウイルスベクターは優れたツールとなりうる。我々の開発した技術が、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

本研究は国立医薬品食品衛生研究所早川堯夫副所長（前生物薬品部長）の指導のもと、国立医薬品食品衛生研究所遺伝子細胞医薬部のメンバーをはじめ多くの研究者の協力のものとなされたものであり、この場をかりて謝意を表したい。

文献

- 1) H. Mizuguchi, M. A. Kay. *Hum. Gene Ther.*, 9, 2577-2583 (1998)
- 2) H. Mizuguchi, M. A. Kay. *Hum. Gene Ther.*, 10, 2013-2017 (1999)
- 3) H. Mizuguchi, N. Koizumi, T. Hosono, N. Utoguchi, Y. Watanabe, M.A. Kay, T. Hayakawa. *Gene Ther.*, 8, 730-735 (2001)
- 4) H. Mizuguchi, T. Hayakawa. *Gene*, 285, 69-77 (2002)
- 5) H. Mizuguchi, T. Hayakawa. *Cancer Gene Ther.*, 9, 236-242 (2002)
- 6) H. Mizuguchi, K. Koizumi, T. Hosono, A. Ishii-Watabe, E. Uchida, N. Utoguchi, Y. Watanabe, T. Hayakawa. *Gene Ther.*, 9, 769-776 (2002)
- 7) H. Mizuguchi, M.A. Kay, T. Hayakawa. *BioTechniques*, 30, 1112-1116 (2001)
- 8) H. Mizuguchi, T. Hayakawa. *J. Gene Med.*, 4, 240-247 (2002)