薬 剤 学, **67** (3), 172–175 (2007)

≪若手研究者紹介≫

安全性と機能性に優れたDDS技術の開発

小 泉 直 也 Naoya Koizumi
昭和薬科大学薬剤学研究室

1. は じ め に

思えば著者は誠にラッキーな研究生活を過ごし，今日まで辿り着いている．始まりは昭和薬科大学4年生の時に松本光雄教授の主宰する薬剤学研究室に配属したことであり，これが自堕落な著者の運命を変えたことは間違いない．厳しいことで有名な同研究室に所属し，恩師である渡邊善照助教授（現昭和薬科大学教授），藤井まき子講師（現昭和薬科大学助教授），宇都口直樹助手（現帝京大学助教授）から，努力すれば必ず結果が得られるという研究の面白さを教えて頂き，調子に乗って大学院への進学を決意した．しかしながら，同研究室への大学院進学希望者は8人と多く，劣等生であった著者は成績的にはその8番目であった．結果的に著者は大学院への進学を成し遂げるのであるが，実は優秀な同期達が他大学や大学院医療コースに進学したためギリギリで滑り込めたのである．この時に人生の運を半分以上消費したことは間違いない．大学院に進学し，さらに大きな転機となったのが国立医薬品食品衛生研究所の早川堯夫部長（現医薬品医療機器総合機構顧問）が主宰する生物薬品部に外部研究生としてお世話になり，水口裕之主任研究官（現医薬基盤研究所プロジェクトリーダー）の下で研究させて頂いたことである．水口裕之先生の下，今日の研究テーマでもあるDrug delivery system（DDS）やアデノウイルスベクターによる遺伝子導入技術の開発に携わることができたことは貴重な時間であり，この時期に研究者の道を決意した．その後，博士後期課程の時に研究室に異動されて来た近藤昌夫講師（現大阪大学助教授）にも多くの助言を頂き，研究者としての考え方を教えて頂いた．著者の研究姿勢は多くの先生方と共に一流の研究をさせて頂いたことを礎にしていることは間違いなく，諸先生方との出会いは研究者として誠にラッキーなものであった．現在は母校の昭和薬科大学にて渡邊善照教授の下，先生方に教えて頂いたことを学生達に還元すべく，教育と研究に没頭する毎日であるが，逆に学生達に多くのことを学ばせてもらっているような気がする今日この頃である．

さて，前置きが長くなったが，今回若手研究者紹介のコラムにて書かさせていただく研究成果は，主に大学院およびポスドク時代（医薬基盤研究所遺伝子導入制御プロジェクト）の研究成果であり，安全性と機能性を併せ持った新規アデノウイルス（Ad）ベクターの開発に関する研究を紹介する．本研究は，現在著者が取り組んでいる遺伝子デリバリーシステムの構築と，分子メカニズムを利用した薬物吸収に関する研究の礎となっている．貴重な時間を割いて読んで頂いている読者の皆様に少しでも興味を持って頂ければ幸いである．

2. ファイバー改変型Adベクターの開発

遺伝子治療とは「疾病の治療を目的として遺伝子

筆者紹介：平成17年昭和薬科大学大学院薬学研究科博士課程修了．博士（薬学）．独立行政法人医薬基盤技術研究所基盤研究部遺伝子導入制御プロジェクト派遣研究員を経て，平成18年4月昭和薬科大学薬剤学研究室助手．平成18年遺伝子・デリバリー研究会第6回シンポジウム奨励賞受賞，日本薬剤学会第31回製剤セミナーPostdoctoral Presentation Award受賞，現在に至る．研究のモットー：Enjoy Science!! 趣味：カメラ，山登り，スノーボード，ツーリング，最近始めたサーフィン．

又は遺伝子を導入した細胞を人の体内に投与すること」と厚生労働省の指針に定義されており，他の治療法に比べ，比較的新しい治療方法である．遺伝子治療は，1990年にアメリカにて臨床研究が本格的にスタートし，これまで多くの疾病に対して臨床応用されてきたが，当初考えられていたような夢の治療方法とはならず，一部の疾患を除いて十分な治療効果が得られていないのが現状である．その最大の原因は，目的の細胞に遺伝子を入れるための導入技術が，必要な機能を十分に備えていないことである．つまり，目的の細胞に効率よく遺伝子を導入し目的以外の細胞には影響を与えない（副作用回避）等の機能が不十分であったことから，これら機能を持つ新規遺伝子導入ベクターの開発が現在盛んに行われている．一方，Adベクターは高い遺伝子導入効率を持つことから，現在ヒトへの遺伝子治療臨床研究にもっとも汎用されている遺伝子導入ベクターの一つである[1]．しかし，遺伝子治療の重要なターゲット細胞である一部の癌細胞や種々の幹細胞等には，Ad受容体の発現が低くAdベクターが細胞に結合できないため，遺伝子を十分に導入できないことが知られている[2,3]．そこで，著者らは遺伝子治療用ベクターとして汎用されているAdベクターを改変することで，種々の細胞に遺伝子導入が可能な新規ベクターを開発した[4～6]．つまり，細胞表面分子として多くの細胞に発現している，インテグリンまたはヘパラン硫酸を認識し感染可能な改変型Adベクターを作製し，その遺伝子治療用ベクターとしての有用性を検討した．Adベクターの細胞への感染はカプシド蛋白質であるファイバーと細胞表面のcoxsackievirus and adenovirus receptor（CAR）が結合することが第一ステップである[7]．そこでAdベクターのファイバー先端にインテグリンとの親和性を示すRGD(アルギニンーグリシンーアスパラギン酸）配列，またはヘパラン硫酸と親和性を示すポリリジン（リジンが7つ）配列を組み込んだファイバー改変型Adベクター（それぞれAdRGD-L2, AdK7-L2）を作製した（Fig. 1）．これらファイバー改変型Adベクターは細胞表面上のインテグリンやヘパラン硫酸を認識し感染可能であり，CAR陰性細胞に対して従来型Adベクター（Ad-L2）の100倍以上の遺伝子導入効率を示した（Fig. 2）[6]．本改変型Adベクターの開発は，これまで遺伝子導入が

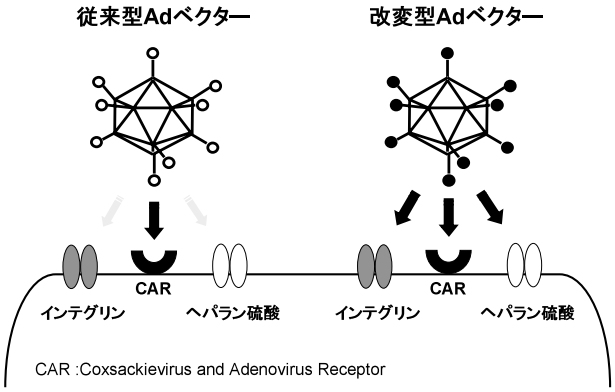

Fig. 1. 改変型Adベクターの概念図

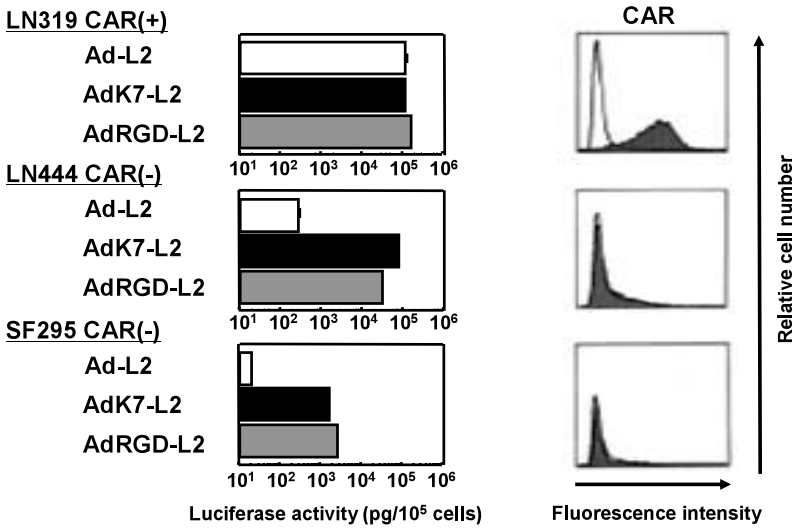

Fig. 2. Comparison of Luciferase Production in Human Cultured Cells Transduced by Ad-L2, AdK7-L2, AdRGD-L2.
Cells were transduced with 3000 Vector Particle/cell of Ad-L2, AdK7-L2, AdRGD-L2 for 1.5 h. After culturefor 48 h, luciferase production was measured by a luminescent assay.

難しかった細胞に対しても効率的に遺伝子導入が可能となるだけでなく，短鎖ペプチドをカプシド蛋白質に発現させることでAdベクターの感染域を自由に改変できることを意味しており，遺伝子DDS技術としての応用が可能であると考えられる．

3. 動物個体を用いた改変型Adベクターの有用性評価

培養細胞での改変型Adベクターの有用性が示されたことから，次に動物個体での遺伝子導入効率を検討した．遺伝子治療臨床研究において最もAdベクターが用いられる疾病は癌であることから，固形癌に直接改変型Adベクターを投与し遺伝子導入活性を検討した．その結果，インテグリンを認識する改変型Adベクターにおいて，従来型Adベクター以上の高い遺伝子導入効率が認められ，改変型Adベクターの局所投与における有用性が示された（Fig. 3）[6]．データには示さないが，著者らは筋肉内投与においても同様の結果を得ていることから，凝固第VIII因子を骨格筋に産生させる血友病遺伝子治療などにも応用可能ではないかと考えられる．このような補充療法的な遺伝子治療を考えた場合，骨格筋だけでなく肝臓も重要なターゲット組織であることから，次に改変型Adベクターによる肝臓への遺伝子導入効率について検討した．マウス静脈内より改変型Adベクターを投与し，各臓器における遺伝子発現量を測定したところ，ヘパラン硫酸を認識する改変型Adベクターが肝臓に対して最も高い遺伝子発現を示した（Fig. 4）[8]．さらに，Adベクターは静脈内投与後に肝障害を示すことが知られていることから，改変型Adベクターの肝障害性についても検討した．その結果，改変型Adベクターでは肝障害のマーカーである血清中ALT濃度が従来型Adベクターに比べ著しく減少していた（Fig. 5）．著者らは改変型Adベクターによる肝障害低下のメカニズムとして，炎症性サイトカインの産生低下が関与していることを明らかとしているが，紙面の都合上データは割愛させていただく[8]．

これらの結果より，著者らはAdベクターの感染受容体を改変することで局所での遺伝子発現，およ

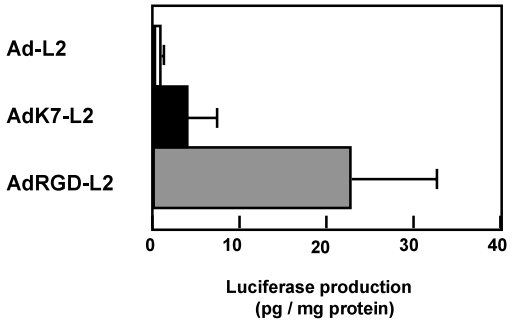

Fig. 3. Intratumoral Luciferase Production in Mice after Intratumoral Injection of Ad-L2, AdK7-L2, or AdRGD-L2.
Ad-L2, AdK7-L2, or AdRGD-L2 (1.0×10^{9} VP) was injected intratumorally into B16-bearing mice. Two days later, the tumors were isolated, and luciferase production was determined.

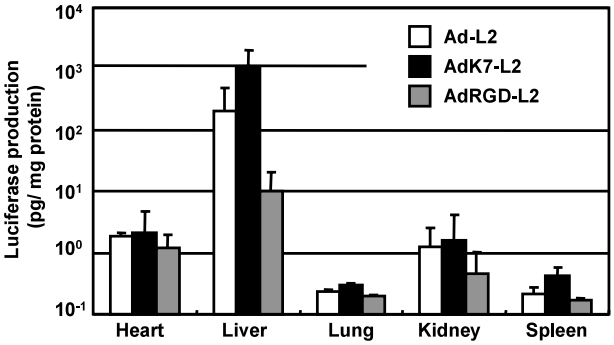

Fig. 4. Luciferase Production after the Intravenous Administration of Ad-L2, AdK7-L2, or AdRGD-L2 into Mice.
Ad-L2, AdK7-L2, or AdRGD-L2 (1.0×10^{10} VP) was intravenously injected into the mice. Forth-eight hours later, the heart, lung, liver, kidney, and spleen were harvested and luciferase production was measured by a luciferase assay system.

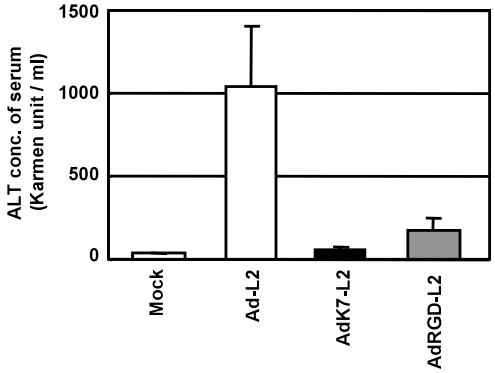

Fig. 5. Liver Enzyme Levels in Serum after the Intravenous Administration of Ad-L2, AdK7-L2, or AdRGD-L2 into Mice.
Blood samples were collected by inferior vena cave at 48 hours after intravenous administration of Ad-L2, AdK7-L2, or AdRGD-L2 (3.0×10^{10} VP). Alanine Aminotransferase (ALT) levels in the serum were measured using a Transaminase-CII kit.

び静脈内投与後の肝臓での遺伝子導入効率を上昇させることに成功した．さらにこれら改変型ベクターは肝障害性を減少させ，安全性に優れていることを見出した．このことは既存のウイルスベクターを人為的に改変した改変型ウイルスベクターが，機能性と安全性を兼ね備えた遺伝子治療用ベクターになりうることを示す成果であり，さらなる有用性を持つ遺伝子導入ベクターの開発が期待される．

4. お わ り に

遺伝子導入技術はまさに日進月歩の勢いで開発・研究されており，その多様性は広がり続けている．疾患の種類により使用される薬や剤形が違うように，将来的には治療用遺伝子やベクターも疾患別に多様化されることが考えられる．また，最近では遺伝子を導入し蛋白質を発現させるだけではなく，RNAi のように疾患原因遺伝子をノックダウンさせることも可能となり[9,10]，治療戦略も多様化が進んでいる．このように様々に応用されていく遺伝子治療に対応する技術の開発が今後求められていくと予想され，著者の研究が少しでも貢献できることを願っている．

最後に，本研究の多くは医薬基盤研究所遺伝子導入制御プロジェクト在籍時に進められた研究であり，プロジェクトリーダーである水口裕之先生，および川端健二先生，櫻井文教先生をはじめとする室員の皆様には大変お世話になり，心より感謝致します．

引 用 文 献

1) M.L. Edelstein, M.R. Abedi, J. Wixon, R.M. Edelstein, Gene therapy clinical trials worldwide 1989–2004—an overview, *J. Gene Med.*, **6**, 597–602 (2004).
2) D.T. Rein, M. Breidenbach, D.T. Curiel, Current developments in adenovirus-based cancer gene therapy, *Future Oncol.*, **1**, 137–143 (2006).
3) K. Kawabata, F. Sakurai, N. Koizumi, T. Hayakawa, H. Mizuguchi, Adenovirus vector-mediated gene transfer into stem cells, *Mol. Pharm.*, **2**, 95–103 (2006).
4) H. Mizuguchi, N. Koizumi, T. Hosono, N. Utoguchi, Y. Watanabe, M.A. Kay, T. Hayakawa, A simplified system for constructing recombinant adenoviral vectors containing heterologous peptides in the HI loop of their fiber knob, *Gene Ther.*, **9**, 730–735 (2001).
5) N. Koizumi, H. Mizuguchi, T. Hosono, A. Ishii-Watabe, E. Uchida, N. Utoguchi, Y. Watanabe, T. Hayakawa, Efficient gene transfer by fiber-mutant adenoviral vectors containing RGD peptide, *Biochim. Biophys. Acta*, **1**, 13–20 (2001).
6) N. Koizumi, H. Mizuguchi, N. Utoguchi, Y. Watanabe, T. Hayakawa, Generation of fiber-modified adenovirus vectors containing heterologous peptides in both the HI loop and C terminus of the fiber knob, *J. Gene Med.*, **4**, 267–276 (2003).
7) J.M. Bergelson, J.A. Cunningham, G. Droguett, E.A. Kurt-Jones, A. Krithivas, J.S. Hong, M.S. Horwitz, R.L. Crowell, R.W. Finberg, Isolation of a common receptor for Coxsackie B viruses and adenoviruses 2 and 5, *Science*, **275**, 1320–1323 (1997).
8) N. Koizumi, T. Yamaguchi, K. Kawabata, F. Sakurai, T. Sasaki, Y. Watanabe, T. Hayakawa, H. Mizuguchi, Fiber-modified adenovirus vectors decrease liver toxicity through reduced IL-6 production, *J. Immunol.*, **3**, 1767–1773 (2007).
9) T. Hosono, H. Mizuguchi, K. Katayama, Z.L. Xu, F. Sakurai, A. Ishii-Watabe, K. Kawabata, T. Yamaguchi, S. Nakagawa, T. Mayumi, T. Hayakawa, Adenovirus vector-mediated doxycycline-inducible RNA interference, *Hum. Gene Ther.*, **8**, 813–819 (2004).
10) T. Hosono, H. Mizuguchi, K. Katayama, N. Koizumi, K. Kawabata, T. Yamaguchi, S. Nakagawa, Y. Watanabe, T. Mayumi, T. Hayakawa, RNA interference of PPARgamma using fiber-modified adenovirus vector efficiently suppresses preadipocyte-to-adipocyte differentiation in 3 T3-L1 cells, *Gene*, **348**, 157–165 (2005).