薬 剤 学, **69** (2), 99–102 (2009)

≪若手研究者紹介≫

安全性の高い遺伝子治療を目指した新規アデノウイルスベクターシステムの開発

桜 井 晴 奈* Haruna Sakurai
摂南大学薬学部生化学研究室

1. は じ め に

著者は大阪大学大学院薬学研究科博士後期課程への進学をきっかけに薬剤学の世界に出会った．大学入学当初から『研究者』という職業に憧れを抱いていた著者は，恩師である昭和大学薬学部教授・百瀬和享先生（現名誉教授）や国立医薬品食品衛生研究所部長　川西徹先生をはじめとする多くの諸先生方からの厳しくも温かくもある指導と激励を受け，博士課程への進学を決心した．進学の相談に乗ってくださった百瀬先生や川西先生から「自分が何をしたいのか，何を知りたいのかを考えて行き先を決めなさい」とのアドバイスを頂いた著者は，『病気の治療に直結する研究をしたい』と新たな分野への挑戦を決意し，大阪大学大学院薬学研究科助教授・中川晋作先生（現教授）率いる薬剤学分野に身元を引き受けていただく形で『遺伝子治療を目指したベクター開発』を研究テーマとして掲げる医薬基盤研究所・水口裕之プロジェクトリーダーのもとへと進学した．『スピーディに，かつスマートに』をモットーとする水口研の研究スタイル，さらに中川先生から注いでいただいた深い愛情（著者の片思いかもしれないが）と情熱が最終的に大学教員としての道を選択する著者の心に大きな影響を与えたことは間違いない．

さて，本稿では著者が博士課程在学時に行った『全身投与による遺伝子治療を目指した安全性の高い遺伝子導入用ベクターの開発』に関する研究成果を紹介させていただく．『病気の治療に直結する研究をしたい』という著者の願いをかなえてくれたこの研究との出会いを本当に嬉しく思う．本稿が忙しい研究者に与えられた小さな待ち時間のお供になれば幸いである．

2. 自然免疫応答の回避を目指した新規アデノウイルスベクターシステムの開発

1990年，当時4歳だったアシャンティに対し世界初の遺伝子治療が行われた．重症複合型免疫不全症（SCID）を患い無菌室から出ることができなかった彼女は，治療後には外に出て遊び，学校に通うまでに回復した．そんな世界中の研究者に夢と希望を与えた遺伝子治療の成功例が実現してから約20年が経とうとしている．この間に様々な疾患に対する遺伝子治療臨床実験が実施されてきたが，未だ有効な治療効果を示すことが出来た例は多くない．この背景には，遺伝子を細胞内に運び込む役割を担う遺伝子治療用ベクター開発の遅れがあると考えられる．特に遺伝子治療用ベクターを全身投与する場合，充分な治療効果を得るためには①投与したベクターが免疫応答等の有害事象を誘導せずに②治療遺伝子を標的の臓器にだけ運び，③適時適量発現する必要があるが，現状では全ての項目を満たす遺伝子治療用ベクターの開発には至っていない．したがって，理想的な遺伝子治療用ベクターの開発こそが遺伝子治

*平成20年大阪大学大学院薬学研究科博士後期課程修了．博士号（薬学）を取得後，平成20年4月より摂南大学薬学部生化学研究室助教に就任．日本薬剤学会第33回製剤セミナー Postdoctoral Presentation Award受賞，現在に至る．研究のモットー：スピーディに，スマートに．趣味：音楽鑑賞，カラオケ．
連絡先：〒573–0101 枚方市長尾峠町45–1
E-mail: sakurai@pharm.setsunan.ac.jp

療の実現を担う大きな鍵となっている．

アデノウイルス（Ad）ベクターは既存のベクターの中で最も遺伝子導入効率が高く，世界で実施された遺伝子治療臨床研究の約 1/4 で使用されている（2008 年 9 月現在）汎用性の高いベクターである．しかし，1999 年に発生した Ad ベクターの全身投与による死亡事故[1,2] 以来，その適用は局所投与に限局されているのが現状である．この事故は自然免疫応答の過剰な活性化が原因だったことから，Ad ベクターの全身投与による安全性の高い遺伝子治療を実現するためには，全身投与により誘導される自然免疫応答を回避できる新規 Ad ベクターシステムの開発が急務となっている[3]．現在までに我々を含む複数の研究グループから Ad ベクター誘発自然免疫応答を回避するためのアプローチが報告されている[4~6] が，外殻タンパク質の改変[6] や表面修飾[5] など，ベクター側を改変する方法が多く，改変の弊害として Ad ベクターの利点である高い遺伝子発現効率や全身投与による広い発現分布などをも失ってしまう危険性があった．そこで著者らは Ad ベクターにより活性化される免疫シグナルを遮断するという新たなアプローチを用いた自然免疫応答の回避法を考案したので紹介する[7]．著者らはまず Ad ベクター誘発自然免疫応答に関与する遺伝子の探索を行い，サイトカインシグナルのアダプター因子である JAK2 をその候補として見出した（未発表データ）．実際に Ad ベクター誘発自然免疫応答への JAK2 の関与を検討したところ，*in vitro* において JAK2 の活性化が Ad ベクター誘発炎症性サイトカイン産生シグナルに関与していることが明らかとなった（Fig. 1）．そこで，JAK2 の活性化を阻害してサイトカインシグナルを負に制御する分子である Suppressor of cytokine signaling-1（SOCS1）が Ad ベクターにより誘導される自然免疫応答を抑制できるのではないかと考え，次の検討を行った．まず，SOCS1 を安定発現した RAW264.7 細胞（RAW264.7-SOCS1）に Ad ベクターを作用させたところ，コントロールである RAW264.7-neo 細胞と比較して，IL-6 産生が顕著に抑制された（Fig. 2）ことから，SOCS1 が Ad ベクターにより誘導される炎症性サイトカイン産生を抑制することが明らかとなった．次に SOCS1 を発現する Ad ベクター（Ad-SOCS1）を作製しマウスに静脈内投与したところ，

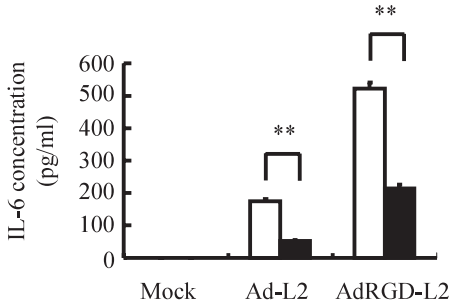

Fig. 1. JAK2 inhibitor II suppresses the Ad vector-mediated cytokine production in RAW264.7 cells. RAW264.7 cells pre-treated with IFN-γ were incubated with JAK2 inhibitor II (50 μM) for 1 h and the cells were stimulated by Ad vectors (10, 000 VP/cell) for 24 h. The concenctration of IL-6 in the cultured supernatants were measured by ELISA. All data represent the means ± S.D. ($n = 3$). $^{**}p < 0.01$.

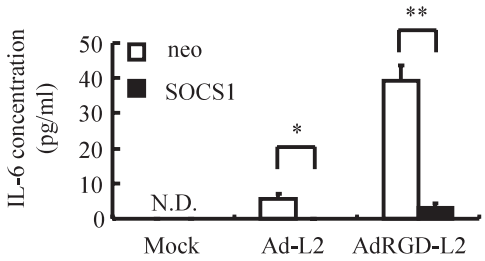

Fig. 2. Ad vector-mediated induction of cytokine production in RAW264.7-SOCS1 cells. IFN-γ -activated RAW264.7-neo cells and RAW264.7-SOCS1 cells were stimulated by Ad-L2 or AdRGD-L2 (10,000 VP/cell) for 24 h. The concentration of IL-6 in the cultured supernatants was measured by ELISA. All data are represented as the means ± S.D. ($n = 3$). $^{*}p < 0.05$, $^{**}p < 0.01$

ルシフェラーゼを発現する Ad ベクター（Ad-L2）を投与した群に比べ，Ad ベクターにより誘導される IL-6 産生が完全に抑制された（Fig. 3）ことから，SOCS1 が *in vivo* において Ad ベクター誘発炎症性サイトカイン産生を抑制することが明らかとなった．SOCS1 による Ad ベクター誘発自然免疫応答回避システムを全ての遺伝子治療用 Ad ベクターに応用するためには，Ad-SOCS1 が自身だけでなく他の遺伝子を発現する Ad ベクターにより誘導される自然免疫応答をも抑制する機能を持つ必要がある．そこで，Ad-L2 と Ad-SOCS1 をマウスの尾静脈に共投与したところ，何も発現しない Ad ベクターである Ad-null と Ad-L2 を共投与した群と比較して，Ad-L2 による高い遺伝子発現効率と広い発現分布を維

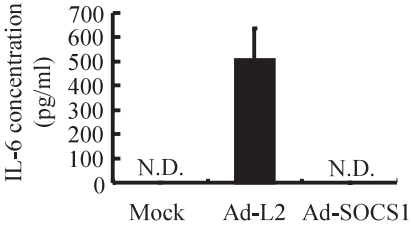

Fig. 3. Inflammatory cytokine productions after the systemic administration of Ad-L2 or Ad-SOCS1 into mice. Ad-L2 or Ad-SOCS1 (5×10^{10} VP/mouse) was i.v. injected into the mice. Six hours later, blood samples were collected from the inferior vena cava, and the concentration of IL-6 in the serum was measured by ELISA. All data are represented as the means ± S.D. ($n = 3$–4).

持したまま（Fig. 4B），Ad-L2 により誘導される IL-6 産生を完全に抑制した（Fig. 4A）．したがって，Ad-SOCS1 は，自身による免疫誘導を回避するだけでなく，共投与した Ad ベクターによる遺伝子発現を妨げることなく免疫誘導だけを回避することが出来る非常に有用なベクターであることが明らかとなった．

3. 終 わ り に

近年，ゲノミクス・プロテオミクス研究の急速な進歩により，疾患と遺伝子，疾患とタンパク質との関連が次々と明らかにされ，遺伝子治療への応用が待たれる状態となっている．一方，遺伝子治療の実現を阻んでいた様々な問題点に対する取り組みも発展し，本稿のような免疫応答回避法の開発だけでなく，標的指向性を持つベクターの開発[8]や，標的組織でのみ治療遺伝子を発現させるような方法の開発[9]も進んでいる．近い将来，理想的な遺伝子治療用ベクターが開発され，ゲノミクス・プロテオミクス研究の成果を応用した遺伝子治療が次々と実現する日が来ることを切に願ってやまない．

最後に，本研究を遂行するにあたりご指導を頂きました(独)医薬基盤研究所遺伝子導入制御プロジェクトの水口裕之プロジェクトリーダー，川端健二サブリーダー，櫻井文教研究員ならびに大阪大学大学院薬学研究科薬剤学分野の中川晋作教授，岡田直貴講師，吉岡靖雄講師，向洋平助教をはじめとする両研究室の皆様に心より感謝いたします．

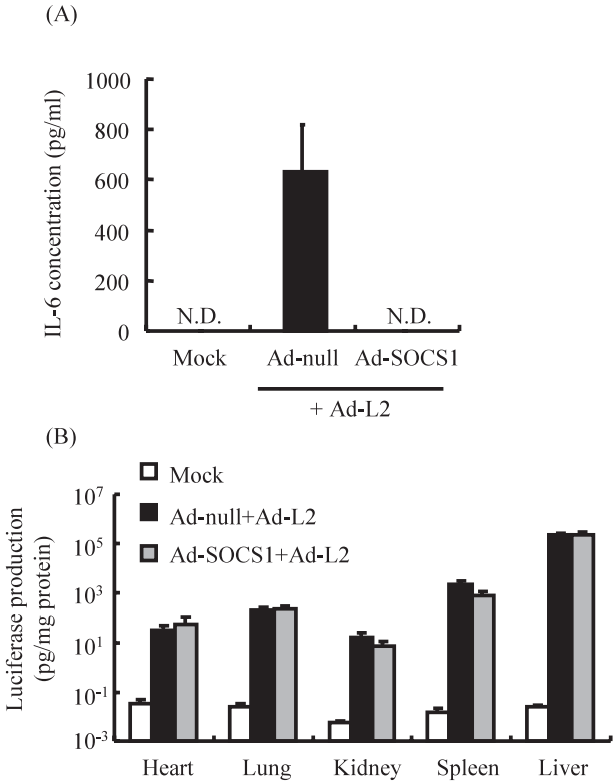

Fig. 4. Inflammatory cytokine productions, luciferase production after the systemic co-injection of Ad-L2 and Ad-SOCS1 into mice. Ad-L2/Ad-null or Ad-L2/Ad-SOCS1 were intravenously co-injected into mice (Ad-L2: Ad-SOCS1 = 1:9; total 5×10^{10} VP/mouse). Blood samples were collected from the fundus oculi at 6 h (A) after injection. The heart, lungs, kidneys, liver and spleen were harvested at 24 h following the injection (B). A, The concentration of IL-6 in the serum were measured by ELISA. B, Luciferase production in each organ was measured using a luciferase assay system. All data are represented as the means ± S.D. ($n = 3$).

引 用 文 献

1) E. Marshall, Gene therapy death prompts review of adenovirus vector, *Science*, **286**, 2244–2245 (1999).
2) S.E. Raper, *et al*., Fatal systemic inflammatory response syndrome in a ornithine transcarbamylase deficient patient following adenoviral gene transfer, *Mol. Genet. Metab*., **80**, 148–158 (2003).
3) H. Sakurai, *et al*., Comparison of gene expression efficiency and innate immune response induced by Ad vector and lipoplex, *J. Control. Release*, **117**, 430–437 (2007).
4) H. Sakurai, K. Kawabata, F. Sakurai, S. Nakagawa, H. Mizuguchi, Innate immune response induced by gene delivery vectors, *Int. J. Pharm*., **354**, 9–15 (2008).

5) B. De Geest, J. Snoeys, S. Van Linthout, J. Lievens, D. Collen, Elimination of innate immune responses and liver inflammation by PEGylation of adenoviral vectors and methylprednisolone, *Hum. Gene. Ther.*, **16**, 1439–1451 (2005).
6) N. Koizumi, et al., Fiber-modified adenovirus vectors decrease liver toxicity through reduced interleukin 6 production, *J. Immunol.*, **178**, 1767–1773 (2007).
7) H. Sakurai, *et al.*, Adenoviral expression of suppressor of cytokine signaling-1 reduces adenovirus vector-induced innate immune responses, *J. Immunol.*, **180**, 4931–4938 (2008).
8) H. Mizuguchi, T. Hayakawa, Targeted adenovirus vectors, *Hum. Gene. Ther.*, **15**, 1034–1044 (2004).
9) X. Yao, *et al.*, TERT promoter-driven adenovirus vector for cancer gene therapy via systemic injection, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **362**, 419–424 (2007).