



Title	体内動態制御を目指したバイオコンジュゲート化アデノウイルスベクターの創製
Author(s)	衛藤, 佑介
Citation	大阪大学, 2008, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/49190">https://hdl.handle.net/11094/49190</a>
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、<a href=" <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed</a> ">大阪大学の博士論文について</a>をご参照ください。

*The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA*

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

氏名	衛藤佑介
博士の専攻分野の名称	博士(薬学)
学位記番号	第21955号
学位授与年月日	平成20年3月25日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 薬学研究科応用医療薬科学専攻
学位論文名	体内動態制御を目指したバイオコンジュゲート化アデノウイルスベクターの創製
論文審査委員	(主査) 教授 中川晋作 (副査) 教授 八木清仁 教授 馬場明道 教授 土井健史

### 論文内容の要旨

近年の分子生物学・網羅的ゲノミクス研究の進展により、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共に、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、癌・AIDSなど未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に注目が集まっている。特に、世界的に死亡原因の上位を占める癌に対する癌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更なる発展が期待されている。一方で、遺伝子治療の一層の進展にはその根幹を成す遺伝子導入技術(ベクター)の開発が必須であり、標的細胞・組織へ高効率に遺伝子送達可能とする DDS(Drug Delivery System)技術を確立することが重要な課題となっている。

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。このような利点を有する Ad は、現在遺伝子治療研究において最も繁用される遺伝子導入用ベクターであり、腫瘍への局所投与による癌遺伝子治療においても、優れた治療効果が国内外で数多く報告されている。一方で、現在の Ad を用いた治療プロトコールは、肉眼で観察できる癌病巣への局所投与に限局されており、微小癌病巣や癌による死亡原因の第一位である転移癌など全身投与が必要な症例に対する適用は皆無である。Ad の全身投与が困難である主な原因として、①血中に投与された Ad は、その 95% 以上が急速に肝臓へ集積・遺伝子発現することから重篤な肝障害を誘発すること、②肝臓以外の組織への特異的な遺伝子導入能に乏しいことから、治療効果を得るために大量の Ad を投与せざるを得ず必然的に副作用を誘発すること、③約 80% のヒトが Ad に対する中和抗体を有しており、作用が減弱すること、④抗原性が高いこと、などの問題が挙げられる。従って今後、全身性の転移癌や微小癌病巣など、より広範な癌種に対する治療展開を実現するためには、これら問題点を克服し得る全身投与型 Ad の開発が必要不可欠である。

そこで本研究では、上記問題点を克服すると共に、微小癌や転移癌をも治療可能な全身投与型ベクターの開発を目的に、「水溶性高分子ポリエチレングリコール(PEG)によるバイオコンジュゲート化 Ad の開発」を試みた。PEG で修飾した Ad (PEG-Ad) は、PEG鎖の立体障害により、Ad の感染受容体である CAR を介した肝臓への分布が低

下すると共に、蛋白質や粒子を PEG 修飾した場合と同様に、血中滞留性の延長に基づく Enhanced Permeability and Retention (EPR) 効果による腫瘍への受動的ターゲティングが期待できる。さらに PEG-Ad の PEG 鎖先端に標的指向性分子を付与することで、能動的ターゲティングへの応用も可能になると考えられる。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無く、PEG 修飾率-体内動態-遺伝子発現活性の相互連関に関する基礎情報も全く存在しない。そこでまず、PEG 修飾率の異なる様々な PEG-Ad を作製し、修飾率に応じた体内動態及び遺伝子発現特性の体系的な評価に取り組んだ。

作製した各 PEG-Ad をマウスの尾静脈内へ投与し体内動態を検討したところ、PEG 修飾率の増大に伴い血中滞留性の飛躍的な延長ならびに 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 倍もの集積が見られた。また、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 30 分の 1 以下にまで抑制された。さらに、各 PEG-Ad の遺伝子発現特性を検討した結果、*in vitro* における遺伝子発現活性は修飾率の増大に伴い単純に減少するのに対して、様々な要因が影響し合う *in vivo*においては、未修飾 Ad と比較して腫瘍での遺伝子発現活性が約 40 倍増強し、肝臓では約 20 分の 1 に低下し得る、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。全身投与により、これほどまで強い腫瘍選択性な遺伝子発現を達成した例は無く、初めての知見である。そこで次に、抗腫瘍作用を有するサイトカインである腫瘍壊死因子(TNF  $\alpha$ ) を発現する Ad (Ad-TNF  $\alpha$ ) を用い、本アプローチの原発癌並びに転移癌治療モデルにおける有用性評価を試みた。その結果、修飾率約 90% の PEG-Ad-TNF  $\alpha$  は、Ad を全身投与した際の致命的な副作用である肝障害を軽減しつつ、両モデルにおいて EPR 効果に基づく顕著な抗腫瘍効果を示すことを明らかとし、PEG-Ad が転移癌をも標的とした全身投与型ベクターの有望な候補であることを実証した。

本 PEG-Ad は受動的ターゲティングにより高い腫瘍移行性を有するが、更なる有効性の向上には、能動的ターゲティングを可能とする新規 PEG-Ad の開発が必須である。そこで次に、標的指向化モデル Ad としてインテグリン指向性の RGD ペプチドを PEG 鎖先端に付与した RGD-PEG-Ad を作製し、PEG-Ad の能動的ターゲティングへの応用を試みた。その結果、CAR 低発現・インテグリン高発現の細胞において、RGD-PEG-Ad はインテグリンを介して未修飾 Ad の約 100 倍、PEG-Ad より数百倍高い遺伝子発現活性を示すことを明らかとした。さらに、RGD-PEG-Ad は PEG 修飾の利点である中和抗体回避能をも有することを明らかとし、能動的ターゲティングを目指した本アプローチの有用性が示唆された。本研究では、標的指向化 Ad のモデルとして修飾率約 40% のインテグリン指向性 RGD-PEG-Ad を用いたが、今後組織特異的な結合性を有する標的指向性分子を、前述した修飾率 90% の PEG-Ad に適用すると共に、PEG 修飾率-標的指向性分子提示量-体内動態-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化 Ad の創製に繋がるものと期待される。

以上、本研究では Ad の体内動態制御を目指した PEG-Ad の創製に取り組み、その PEG 修飾率、体内動態、遺伝子発現活性などの連関を明らかにすると共に、修飾率の最適化による受動的ターゲティングに基づいた腫瘍標的化 Ad の創製に成功した。さらに、PEG 鎖先端に標的指向性分子を付与することで、能動的ターゲティングに基づいた標的指向化モデル Ad の創製に成功し、本アプローチの有用性を明らかとした。本研究成果は、多様なベクター、多様な修飾分子に対して応用可能な基盤技術であり、次世代のベクター開発をはじめとする幅広い分野に貢献出来るものと期待する。

## 論文審査の結果の要旨

近年の分子生物学・網羅的ゲノミクス研究の進展により、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共に、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、癌・AIDS など未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に注目が集まっている。しかしこの遺伝子治療の進展にはその根幹を成す遺伝子導入技術（ベクター）の開発が必須であり、標的細胞・組織へ高効率に遺伝子送達可能とする DDS (Drug Delivery System) 技術を確立することが重要な課題である。本研究では、全身性の転移癌、微小癌をも標的とし得る体内動態制御型 PEG 修飾アデノウ

イルスベクター（PEG-Ad）の創製に取り組み、以下のような結論を得た。

1. 腫瘍標的化を目指した PEG-Ad の創製には、血中滞留性、腫瘍組織移行性、副作用発現組織（肝臓）移行性、遺伝子発現活性などの連関評価が非常に重要であることを明らかとした。特に修飾率 90%の PEG-Ad が、肝集積性の抑制並びに EPR 効果を利用した腫瘍標的化に最も適していることを見出した。
2. 修飾率 90%の TNF $\alpha$  発現 PEG-Ad は、担癌マウス及び肺転移癌マウスに対して、副作用を抑制しつつ EPR 効果に基づく顕著な抗腫瘍効果を示すことを明らかとし、PEG-Ad が転移癌をも標的とした全身投与型ベクターの有望な候補であることを実証した。
3. PEG 鎮先端に標的指向性モデル分子として RGD を付与した RGD-PEG-Ad を作製し、本ベクターが PEG 修飾の利点である中和抗体回避能のみならず、標的分子を介した遺伝子導入特性を同時に兼ね備えていることを明らかとした。

以上、本研究ではアデノウイルスベクター（Ad）の体内動態制御を目指した PEG-Ad の創製に取り組み、その PEG 修飾率、体内動態、遺伝子発現活性などの連関を明らかにすると共に、修飾率の最適化による受動的ターゲティングに基づいた腫瘍標的化 Ad の構築を提案し、その有用性を実証した。さらに PEG-Ad への能動的ターゲティング能の付与に、PEG 片末端への標的化リガンドの付与が有用なアプローチであることを明らかとした。本研究成果は、多様なベクター、多様な修飾分子に対して応用可能な基盤技術であり、次世代のベクター開発をはじめとする幅広い分野に貢献できることを示すものであり、博士（薬学）の学位を授与するにふさわしいものと考える。