The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

| | |
|---|---|
| Title | 外殻タンパク質の最適化とターゲティング分子の挿入による標的組織指向型アデノウイルスベクターの開発 |
| Author(s) | 松井, 勇人 |
| Citation | 大阪大学, 2013, 博士論文 |
| Version Type | VoR |
| URL | https://hdl.handle.net/11094/54710 |
| rights | |
| Note | |

*The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA*

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

The University of Osaka

【9】

| | |
|---|---|
| 氏　　名 | 松　井　勇　人（まつ い はや と） |
| 博士の専攻分野の名称 | 博　士（薬学） |
| 学 位 記 番 号 | 第　２５９６１　号 |
| 学位授与年月日 | 平成25年３月25日 |
| 学位授与の要件 | 学位規則第４条第１項該当<br>薬学研究科分子薬科学専攻 |
| 学 位 論 文 名 | **外殻タンパク質の最適化とターゲティング分子の挿入による標的組織指向型アデノウイルスベクターの開発** |
| 論 文 審 査 委 員 | （主査）<br>教　授　水口　裕之<br>（副査）<br>教　授　中川　晋作　　教　授　八木　清仁　　教　授　藤尾　　慈 |



## 論 文 内 容 の 要 旨

アデノウイルス（Ad）ベクターは既存の遺伝子導入用ベクターの中でも最も優れた遺伝子導入活性を有するベクターの１つである。Ad ベクターは C 群に属する 5 型 Ad を基本骨格としており、分裂細胞・非分裂細胞を問わず遺伝子導入可能であること、物理的に安定であるため超遠心による濃縮が可能であること、容易に高力価のベクターが得られることなど、遺伝子導入用ベクターとして優れた基本的性質を備えており、遺伝子治療臨床研究のみならず基礎研究においても広く用いられている。しかしながら、従来の Ad ベクターは生体内投与後、血中から速やかに消失し、生体内に存在する抗 Ad 中和抗体により遺伝子導入が阻害されるという欠点が知られている。さらには、肝臓への集積性が高いため、肝臓以外の他の臓器への遺伝子導入が困難であり、なおかつ肝障害を誘発するといった問題点が報告されている。従って、より有効で安全な遺伝子治療を達成するためには、これらの問題を克服した標的組織特異的に遺伝子導入可能な Ad ベクターの開発が必要である。これまでに、がん細胞への Ad ベクターの標的指向性の向上を目指し、Ad 外殻タンパク質であるファイバー領域に、$\alpha_v$ インテグリンに結合する RGD（Arg-Gly-Asp）ペプチドやヘパラン硫酸に結合するポリリジンペプチドなどの外来ペプチドを挿入した Ad ベクターが開発されてきた。しかしながら、これら外来ペプチドの標的となる$\alpha_v$ インテグリンやヘパラン硫酸は正常組織においても低いながらも広範に発現しているため、がん細胞へのターゲティング能は不十分であった。また、外来ペプチドの挿入だけでは Ad ベクターの低い血中滞留性と抗 Ad 中和抗体による阻害は克服できないことから、未だに十分なターゲティング能を有する Ad ベクターの開発には至っていないのが現状である。上記のことを踏まえ、真に標的組織特異的に遺伝子導入可能な Ad ベクターを開発するためには、肝集積性の減弱、抗 Ad 中和抗体からの回避及び血中滞留性の向上を達成し、より組織特異性の高いターゲティング分子の付与が必要不可欠であると考えられる。そのためには、遺伝子工学的手法による外来ペプチドの Ad 外殻タンパク質への挿入といった従来の手法のみならず、Ad 外殻タンパク質そのものの改変や、新たなターゲティング分子の提示及びそれに適した Ad 外殻タンパク質の最適化に立脚した Ad ベクターの構築が重要であると考えられる。

これまでの研究で、Ad ベクターの血中滞留性を向上させるための手段として、Ad 粒子表面をポリエチレングリコール（PEG）分子で修飾した PEG 化 Ad（PEG-Ad）ベクターが開発されてきた。この方法では、血中滞留性の向上ならびに抗 Ad 中和抗体からの回避が認められたものの、PEG 化される部位がランダムであるため Ad ベクターの感染に重要なファイバー領域まで PEG 化されてしまい、遺伝子導入活性が低下するといった問題点が指摘されている。そこで本論文ではまず、Ad の主要外殻タンパク質であるヘキソン特異的な PEG 化を目指し、Factor X（FX）がヘキソン特異的に結合する性質を利用することとした。すなわち、PEG 化 FX（PEG-FX）を作製し Ad ベクターと混合することで、ヘキソンが特異的に PEG 化された Ad（PEG-FX-Ad）ベクターの開発を試みた。FX を利用することで簡便かつヘキソン特異的に Ad ベクターを PEG 分子で修飾でき、作製した PEG-FX-Ad ベクターは抗 Ad 中和抗体を回避可能であり、血中滞留性が有意に向上していた。このように、FX を利用したヘキソン特異的な PEG 化により Ad ベクターの生体内での動態を変化させることが可能となったことから、今後、PEG-FX による Ad ベクターの修飾は、標的組織特異的に遺伝子導入可能な遺伝子治療用ベクターの開発に向け応用されることが期待できる。

また、標的組織特異的な遺伝子導入を達成するためには、血中滞留性の向上に加え肝臓への集積を回避する必要がある。そこで、Ad 外殻タンパク質のファイバー領域を、B 群に属する 35 型 Ad のファイバーで置換したファイバー置換型 Ad（AdF35）ベクターを利用することとした。AdF35 ベクターは、肝臓への集積性が低いことが報告されており、ターゲティング Ad ベクター開発に向けた基盤ベクターとしての特性を有していると考えられた。このことから本論文では、ファイバー領域に外来ペプチドを挿入可能なターゲティング AdF35 ベクターの開発を試みた。$\alpha_v$ インテグリンとの親和性を有する RGD ペプチドをモデルペプチドとして選択し、開発した AdF35 ベクターシステムに適用したところ、FG loop もしくは HI loop に RGD ペプチドを挿入した AdF35 ベクターは RGD ペプチド依存的に遺伝子導入可能であった。特に HI loop に RGD ペプチドを挿入した場合には、従来の AdF35 ベクターの感染受容体である CD46 依存的な遺伝子導入は消失していることが明らかとなった。さらに、FG および HI loop の両方に RGD ペプチドを挿入することにより、一か所の loop のみに RGD ペプチドを挿入した場合と比較し遺伝子発現効率を大きく上昇させることが可能であった。すなわち、35 型 Ad ファイバーノブ領域に外来ペプチドを挿入することで、CD46 を介さずに、外来ペプチド依存的に効率よく遺伝子導入可能な AdF35 ベクターの開発に成功した。今後、本ベクターは安全な遺伝子治療を達成するためのターゲティング能を有した Ad ベクターの開発に向けた基盤ベクターとしての利用が期待される。

次に、さらに高い標的指向性を有した新規 Ad ベクターの開発を目指し、低分子化抗体様分子である Monobody を Ad 粒子に提示することを試みた。Monobody を従来の Ad ベクターのファイバー領域に挿入してもウイルス粒子が形成されないことが予想されたため、本論文では、ファイバー領域を、比較的大きな分子を提示可能であることが報告されている T4 ファージのフィブリチン由来のファイバーで置換するとともにファイバーノブを欠損させたノブレス Ad ベクターを利用した。すなわち、ノブレス Ad ベクターのファイバーC 末端領域に上皮増殖因子受容体 (Epidermal growth factor receptor; EGFR) もしくは血管内皮増殖因子受容体 (Vascular endothelial growth factor receptor 2; VEGFR2) に結合する Monobody を挿入した Ad ベクターを開発した。その結果、Monobody 提示 Ad ベクターは標的分子に特異的に結合し、Monobody 依存的に効率よく遺伝子導入可能であった。今後、種々の標的分子に対する Monobody を創製することで、様々な標的組織特異的な遺伝子導入を達成するターゲティング Ad ベクターを開発可能であると考えられ、効果的な遺伝子治療への応用が期待される。

以上のように、Ad ベクターのターゲティング能の向上に向けては、化学的あるいは遺伝子工学的な手法を用いての Ad 外殻タンパク質の最適化や、これまで利用が試みられて来なかった Monobody のような新たなターゲティング分子の利用が必要不可欠であると考えられる。将来的には、本研究で試みた Ad 外殻タンパク質の最適化とターゲティング分子の挿入を組み合わせることで、より効率的に標的組織特異的な遺伝子導入を可能とする Ad ベクターの開発を目指したい。



## 論文審査の結果の要旨

アデノウイルス (Ad) ベクターは、C群に属する5型Adを基本骨格としており、既存の遺伝子導入用ベクターの中でも最も優れた遺伝子導入活性を有するベクターの１つであるため、遺伝子治療臨床研究のみならず基礎研究においても広く用いられている。しかしながら、従来のAdベクターは生体内投与後、血中から速やかに消失し、生体内に存在する抗Ad中和抗体により遺伝子導入が阻害されるという欠点が知られている。さらには、肝臓への集積性が高いため、肝臓以外の他の臓器への遺伝子導入が困難であり、なおかつ肝障害を誘発するといった問題点が報告されている。従って、より有効で安全な遺伝子治療を達成するためには、これらの問題を克服した標的組織特異的に遺伝子導入可能なAdベクターの開発が必要である。本研究では、Adベクターのターゲティング能の向上に向けて、Ad外殻タンパク質の化学的な修飾あるいは遺伝子工学的な改変による最適化と、新規ターゲティング分子のAdベクターへの挿入を組み合わせることによって、全く新しい標的組織指向型Adベクターの開発を試み、以下のような結論を得た。

1. 血液凝固第 X 因子 (FX) を利用して Ad の主要外殻タンパク質であるヘキソンを特異的に PEG 修飾した PEG-FX-Ad ベクターは、遺伝子導入活性を維持したまま、従来の Ad ベクターと比較して高い血中滞留性および抗 Ad 中和抗体による阻害回避能を示した。
2. 35 型ファイバーノブの CD46 との結合部位に外来ペプチドを挿入可能なファイバー置換型 Ad ベクターを開発した。$\alpha_v$ インテグリンに結合する Arg-Gly-Asp (RGD) ペプチドを 35 型 Ad ファイバーノブに挿入したところ、CD46 非依存的かつ RGD ペプチド依存的に標的細胞に遺伝子導入することに成功した。
3. 35 型 Ad ファイバーノブ領域の FG、HI ループの両方に外来ペプチドを挿入可能なファイバー置換型 Ad ベクターを作製し、その両方に RGD ペプチドを挿入することで、CD46 陰性細胞に対しさらに効率よく遺伝子導入することに成功した。
4. 血管内皮増殖因子受容体 (VEGFR) 2 もしくは上皮増殖因子受容体 (EGFR) に結合する Monobody をファイバーノブ欠損領域に挿入した Monobody 提示 Ad ベクターを開発し、各標的分子に特異的に結合可能であることを示した。また、Monobody 提示 Ad ベクターは、標的分子発現細胞に対し Monobody 依存的に特異的に遺伝子導入可能であった。

以上、本研究で開発した新規 Ad ベクターは、安全で有効な遺伝子治療の達成に向けたターゲティングベクターの基盤となるとともに、将来的にこれらの技術を組み合わせることで優れたターゲティング Ad ベクターが開発されることが期待され、極めて意義深く、博士（薬学）の学位論文に値するものと認める。