

ウイルスベクターを用いた遺伝子導入

小泉克久・池 中 一 裕

(岡崎国立共同研究機構・生理学研究所神経情報部門)

I. はじめに

遺伝子治療が我が国においても実際に臨床応用され、その効果が期待されている。遺伝子治療においては遺伝子を生体に導入し、疾患を治療する訳であり、効率の高い遺伝子導入法が求められる。ウイルスは進化の過程で効率良く自分自身のゲノムを宿主細胞に挿入できるように種々工夫を凝らしているため、これらの系をうまく遺伝子導入に応用したのがウイルスベクターである。現在良く使われているウイルスベクターには 1) レトロウイルスベクター、2) アデノウイルスベクター、3) アデノ随伴ウイルスベクター (AAV)、4) ヘルペスウイルスベクターがある。これらの他にワクシニアウイルスベクターや昆虫細胞への遺伝子導入のためのバキュロウイルスベクターがあるが、遺伝子治療に使われるより、大量に組み換え蛋白質を得るのに使われる。上記の4つのベクターはそれぞれに特徴があり、時と場合により使い分けことが望まれる。レトロウイルスベクターは分裂している細胞にしか遺伝子導入できず、しかも力価はあまり高くない。しかし、ベクター調製方法が容易であり、直ちに染色体に組み込まれるため、宿主細胞の分裂により導入遺伝子が失われることがない。アデノウイルスは力価の高いウイルス溶液を調製でき、導入効率は最も高い。しかし、組み換えベクターの調製が煩雑であり、細胞毒性の出ることがある。AAVベクターは安定なウイルスベクターであり、高度に精製することが容易であるが、組み込める遺伝子のサイズが小さく(2 kb 程度)また調製にアデノウイルスの共感染が必要である。この点については改良されつつある。ヘルペスウイ

ルスは大きなサイズの遺伝子を神経系で発現させるのに適しているが、やはり調製が煩雑であり、まだあまり頻繁に使われることがないので、本総説では解説しない。

このように、ウイルスベクターはそれぞれに長所、短所があるので、目的に応じてどのベクターを使用するか考慮する必要がある。

II. レトロウイルスベクター

レトロウイルスベクターは開発されて以来、遺伝子治療において欠かせないものとなっているベクターであるが、その理由として遺伝子導入に感染という手段を用いるため、細胞毒性が極めて低い点が挙げられる。また、感染後、ただちに染色体 DNA に1コピー組み込まれるため安定に導入遺伝子が維持され、細胞分裂後もベクターが希釈されず、長期に安定した遺伝子の発現が期待されるからである。しかし、レトロウイルスのもう一つの大きな特徴、すなわち分裂している細胞の染色体にしか組み込まれないという性質は同時に大きな欠点でもある。なぜなら、ほとんどの体細胞は成熟後分裂していないため、レトロウイルスを使って遺伝子導入できないからである。そのため、治療を目的とした場合には遺伝子導入しようという細胞を体外に取り出し、分裂を促進するように条件を設定した後、組み換えレトロウイルスを感染させ、再び体内に戻すという方法をとらなければならない。また、レトロウイルスは染色体上にランダムに挿入されるので、このことが細胞にどのような影響を及ぼすか予想もつかない。しかも、自律複製可能なウイルス (RCR) の出現、ウイルス力価が他の組み換えウイルスと比較して低く、ベクターの構造が複雑になるとさらに低く

なる。また、組み換えアデノウイルスのように濃縮しようとしても、不安定であるためなかなか高力価にすることができないなど、現在いくつかの課題が残されている。これらの諸問題に対して、われわれや他のグループにより、高力価で、しかも安全な遺伝子導入法が開発されつつあるので現況について述べたい。

1) 組み換えレトロウイルスの調製

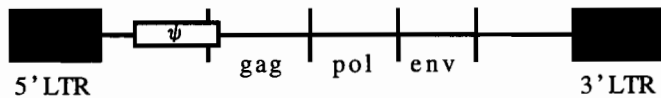
野生型レトロウイルスは、1本鎖のRNAからなるゲノムがウイルス粒子に包まれた構造をしている。ウイルス粒子は gag, pol, env と呼ばれるレトロウイルス由来の3つの遺伝子にコードされている蛋白質で構成されている(図1)。ウイルスが細胞に感染するとゲノムRNAはウイルス由来の逆転写酵素によってDNAに変換され、宿主細胞の染色体に挿入される。このように組み込まれたレトロウイルス遺伝子から再び感染性のレトロウイルスが産生されて細胞外に放出される。

実際に、レトロウイルスを遺伝子導入に用いるには、レトロウイルス由来の3つの遺伝子を目的遺伝子に置換するため、そのままではウイルス粒子が形成できなくなる。そこで通常、パッケージング細胞と呼ばれている特別な細胞を用いて組み換えレトロウイルスを調製する。パッケージング細胞は、レトロウイルスの gag, pol,

env 遺伝子を導入した細胞であるが、これらの遺伝子より作られるウイルス粒子に、ウイルスゲノムが包まれるために必要な領域(パッケージングシグナル)を欠失させた遺伝子を利用している。したがって、この細胞ではウイルスゲノムが産生されず、ウイルス粒子を構成している蛋白質だけが作られている。このパッケージング細胞に、プロウイルスの両端に存在しているレトロウイルスの形成に必要な LTR(long terminal repeats)配列およびパッケージングシグナルを含むプラスミドを導入すれば、その培養上清中に組み換えレトロウイルスが産生される。このプラスミドの両 LTR の間に目的遺伝子を挿入しておけば、組み換えレトロウイルスの感染により標的細胞へ目的遺伝子を導入することが可能となる(図2)。

ほとんどのレトロウイルスベクターは MoMLV(Moloney Murine Leukemia Virus)を基礎にして作成されている。組み換えレトロウイルスベクターの基本構造は、MoMLV の LTR間に目的遺伝子の他、薬剤耐性遺伝子(neo, hyg)などを持ち、2つまたはそれ以上の遺伝子を発現させるため内部プロモーターまたは、IRES(internal ribosomal entry site)などを挿入し構築に色々な工夫が凝らされている(図1)。

Wild Type Provirus



Retrovirus Vector

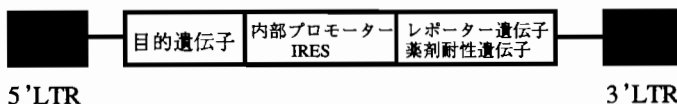


図1. 野生型レトロウイルスとレトロウイルスベクターの構造

LTR : Long Terminal Repeat

IRES : Internal Ribosomal Entry Site

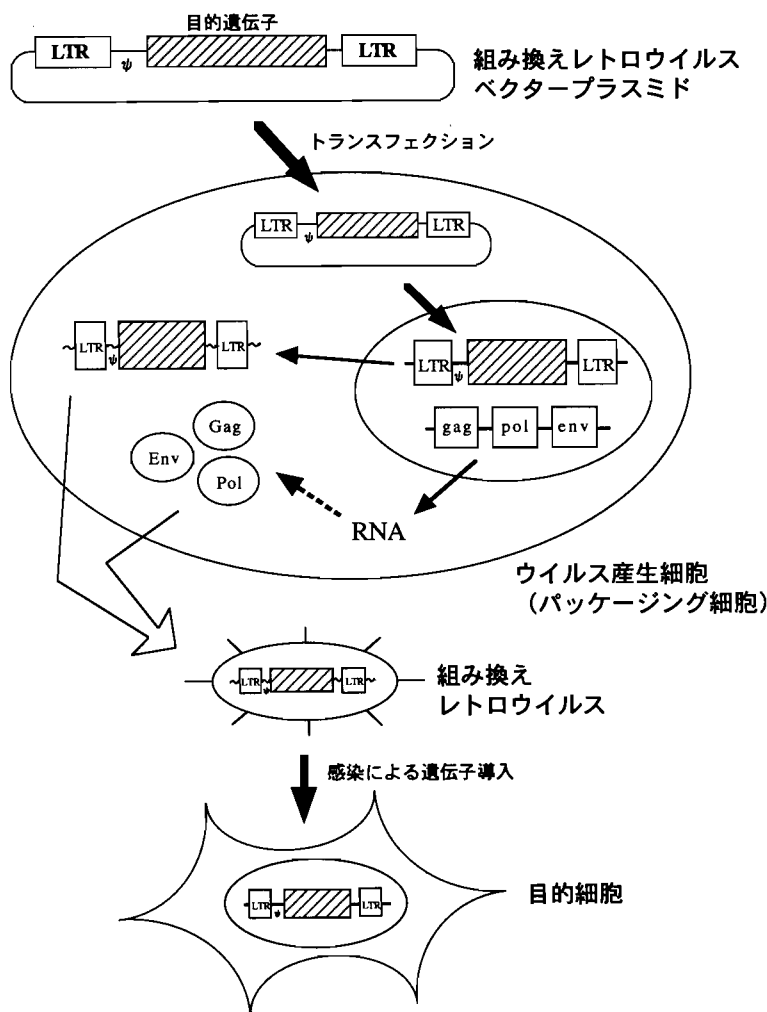


図2. 組換えレトロウイルスの調製法

2) 力価の高いベクターの調製

レトロウイルスによる遺伝子導入の欠点として、感染効率があまり高くないことがあり、これが *in vivo* の遺伝子導入において問題となっている。そのため遺伝子導入効率の向上のため、ベクターの改良による組換えウイルス産生量の増加や、ウイルス液の濃縮法、採取法の改良が行われている。

ベクターの改良については、組換えレトロウイルスの作成の際、ウイルスゲノム RNA がウイルス粒子に組み込まれるためには 5'LTR の下流の Psi と呼ばれるパッケージングシグナ

ル領域を持つことが必要であるが、さらに下流の Gag 遺伝子領域の一部まで含めた長い領域 (Psi⁺) を持つとパッケージング効率が上昇することが Miller ら [1] により明らかとされた。われわれもこの Psi⁺ 領域を含む組換えベクターを作成し従来のベクターと比較すると約10倍ウイルスの力価の上昇が得られた(図3)。また、組換えベクターをパッケージング細胞に導入した際、通常は細胞内に入ったベクターのコピー数は増えないが、これにポリオーマウイルスの初期領域を含んでいると導入された組換えベクターが多コピーに増え、結果的に組み

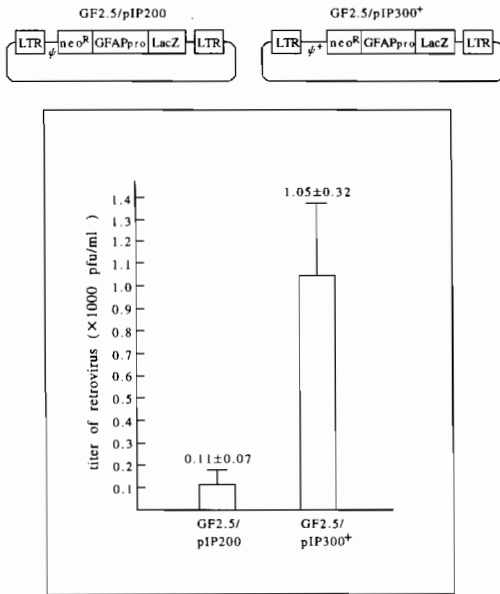


図3. Psi⁺領域によるウイルス力価の上昇

換えウイルスの産生量が増大することが示された[2]。われわれの実験でもこの方法により約10倍の力価の上昇を得ることができた(図4)。さらに1991年頃よりEmiら[3]によりMoMLV由来のゲノムをもち、envelopeとしてvesicular stomatitis virus (VSV)由来のG proteinをもつ pseudotype virus が作成された。当時は力価は低かった($10^2 \sim 10^3$ CFU/ml)が、VSVの宿主域が広いためにハムスターやゼブラフィッシュにも感染可能という利点があった。近年Burnsら[4]はさらに改良を加え、濃縮も行って 10^9 CFU/mlのウイルスを調製することに成功している。

ウイルスの濃縮による力価の向上については、以前より超遠心による方法が行われていた。この方法で我々も数十倍程度の力価の向上を得ていたが、Kotaniら[5]は32℃でウイルス産生細胞を培養することにより、10倍程度力価を向上させ、さらに限外濾過による濃縮で 10^7 オーダーの力価とすることに成功した。レトロウイルス粒子は安定性が悪く様々な状況で失活するが、32℃においては37℃におけるのと比べ培養液中ではるかに安定であり、そのために高力価

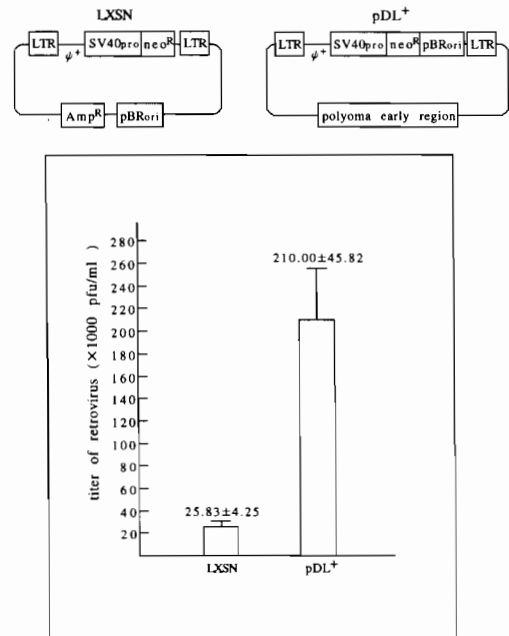


図4. ポリオーマ初期領域によるウイルス力価の上昇

のウイルス液を回収できるようである。我々も2種類のベクターについて比較を行ったところ有意に32℃でのウイルス力価が高いという結果が得られた。

これらの改良は実験室レベルで比較的容易に行うことができ、これにより $10^6 \sim 10^7$ CFU/mlレベルの組み換えレトロウイルスの調製は十分に可能である。また、最近ではFlow-Through Transduction methodなどの新しい遺伝子導入法の研究が行われている[6]。しかし、in vivoの遺伝子導入の効率化のためにはさらなる力価の向上が望まれる。

3) 組織特異的遺伝子導入および発現

レトロウイルスが細胞に感染するには、まず最初にウイルス外被蛋白(Env)と細胞のレセプターが結合しなければならない。ウイルスの種類によってそのEnvが異なるため、組み換えウイルスが感染可能な宿主は、レセプターを細胞表面に発現しているものに限定される。このリガンド—レセプター—相互作用を利用するこ

とで、細胞のターゲッティングを行うことが以前より考えられおり、シュードタイプを用いた実験で、宿主域が変わることが報告されている。Kasahara ら [7] はレトロウイルスベクターの Env にポリペプチドホルモンであるエリスロポエチン (EPO) を連結することにより、EPO レセプターを持つ細胞に効率よく遺伝子導入出来ることを示した。このキメラエンベロープを持つことにより、EPO レセプターを持つ細胞 (主に赤血球) への選択的導入の可能性が示された。また Valsesia-Wittmann ら [8] によっても、インテグリンレセプターをターゲットとした実験で同様な結果が得られている。このようにレトロウイルスが感染できる細胞種を限定できれば、飛躍的にその安全性が増す。

Shimada ら [9,10] は、ヒトのレトロウイルスである human immunodeficiency virus (HIV) を基礎とした新しいベクターの開発を行っている。HIV ベクターは細胞表面の CD4 をレセプターとするためヘルパー T 細胞に特異的に感染する。ウイルスベクターが標的細胞の DNA に組み込まれた (プロウイルス) 後に、初期蛋白質と呼ばれる tat 遺伝子産物 Tat が産生される。HIV ベクターのプロモーターは Tat の存在しない細胞においてその活性が抑制されるため、挿入変異や内部プロモーターとの転写干渉を起こしにくく、MoMLV ベクターと比し優れた点も多い。また逆に、HIV の LTR は Tat の存在下では強力なプロモーター活性 (100 倍以上) を示すため、HIV の LTR の 1 部 (HIV-TAR) を MoMLV ベクターの LTR に組み込みプロモ-

ーター活性を増強させる研究も行われている。また、MoMLV を基礎とした組み換えレトロウイルスとは異なり非分裂細胞にも遺伝子導入ができるため、神経細胞や骨髄幹細胞などへの遺伝子導入にも今後用いられる可能性がある [11]。

一般に、組み換えレトロウイルスは導入された遺伝子の発現に関して組織特異性に乏しいという欠点があるが、内部プロモーターを変更することでその発現に特異性を持たせることができる。われわれは従来、脳特異的に発現する遺伝子の発現機構について研究を進めてきた。その際、遺伝子プロモーター活性を脳細胞初代培養系で測定するため、図 5 に示すようなレトロウイルスベクターを構築した。このプロモーター活性測定系を用いて、われわれはグリオーマ特異的な発現を行うプロモーターを検索した。脳特異的に発現するプロモーターのうちグリオーマ系の細胞特異性を示す MBP (Myelin Basic Protein), PLP (Myelin Proteolipid Protein), GFAP (Glial Fibrillary Acidic Protein) 遺伝子プロモーターを調べたところ、MBP プロモーターがグリオーマにおいては非常に活性が強く、他の細胞 (NIH3T3 fibroblast, A20-2J B lymphoma) ではほとんど発現しなかったため、グリオーマ特異的に発現させるには MBP プロモーターが最適であることが明らかとなった [12]。また、ヘパトーマ細胞にアルブミンのプロモーター/エンハンサーを用いた際にも同様の結果が得られた [13]。

さらに LTR プロモーターを改変することによる細胞種選択的発現も研究されている。現在

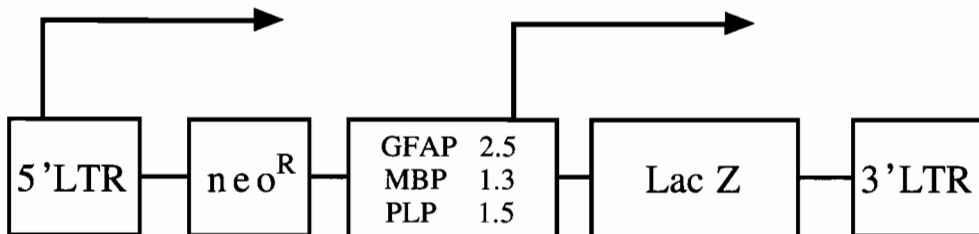


図 5. 組み換えレトロウイルスベクターへの各種内部プロモーターの挿入

GFAP : Glial Fibrillary Acidic Protein

MBP : Myelin Basic Protein

PLP : Myelin Proteolipid Protein

用いられているレトロウイルスベクターの基本構造は、MoMLV プロウイルスからなり、ウイルスゲノムとして必要な LTR、パッケージングシグナルなどのシスエレメントが含まれている。LTR はさらに U3, R そして U5 の 3ヶ所の領域に分けられており、目的遺伝子の発現場所や発現量はプロモーター領域の U3 の性質に依存している。Couture ら [14] は、MoMLV の U3 の位置に他のレトロウイルスのプロモーターを組み込んで、その特異性や発現量を調べた。その結果、ヒトリンパ球由来細胞の JURKAT 細胞や TGF- β 細胞において SL3-3 由来の U3 プロモーターが MoMLV の LTR と比較して 4~5 倍の転写活性を示した。また、ヒトヘパトーマ由来細胞株 HepG2 細胞では、MPSV (myeloproliferative sarcoma virus) 由来 U3 プロモーターで 2 倍程度の転写活性の増加が見られた。

これまでに様々なウイルスベクターが開発されているが、レトロウイルスベクターは現在もなおアメリカで認可されている遺伝子治療の中心的存在である。組織特異的な外来性遺伝子の導入または発現、*in vivo* における補体による不活化など改良の余地が残されているが、今後も益々応用が期待されるベクターである。

Ⅲ. アデノウイルスベクター

アデノウイルスベクターは、非常に高い力価のベクター作成が可能で(感染力価は $10^8 \sim 10^9$ pfu/ml と高い)、非増殖細胞にも遺伝子導入 (*in vivo* 遺伝子導入)が可能であり、遺伝子導入効率が非常に良い(血球系の一部の細胞を除き 100% 近くの標的細胞に導入可能)。さらにウイルス粒子は構造的に安定なため、塩化セシウムステップ密度勾配遠心で 10^{10} pfu/ml の精製ウイルス液とすることも可能であるという特徴を持つ [15]。感染後のウイルスゲノムはレトロウイルスと異なり標的細胞の染色体に組み込まれないが、染色体外にあって複製しないにもかかわらず 2 週間~2 ヶ月間も核内に存在しその発現はかなりの期間持続するとの報告もある。し

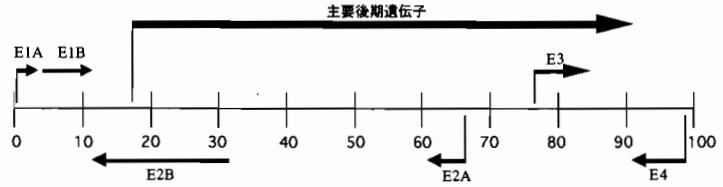
かし、その発現は一過性であり、細胞分裂により希釈されるため持続的な発現のためには組み換えウイルスの反復投与が必要となるが、生体のウイルス中和抗体産生により 2 回目以降はウイルスの不活化による感染効率低下と免疫反応がみられる。さらにウイルス粒子による直接の副反応(細胞傷害性)も重大な問題である。組み換えアデノウイルスの *in vivo* への適用に当たっては、染色体への積極的な組み込みを行わないことから、従来遺伝子導入が困難とされていた神経、筋肉や気道上皮細胞などの非増殖性細胞への遺伝子導入に適している。また、レトロウイルスよりも大きい遺伝子 (~7.5 Kb まで)を導入することができる点も魅力である。

1) アデノウイルスベクターの調製

アデノウイルスは約 36 Kb の 2 本鎖直線状 DNA を持ち、その両端に自身がコードする末端蛋白が共有結合している(図 6)。ヒトアデノウイルス自体はほぼ全ての動物細胞に感染できるが、感染後増殖できるのはヒト細胞に限られ、感染ヒト細胞内では核内で 2, 3 日以内に数千~数万コピーに増殖し、感染細胞は死滅する。ウイルス遺伝子は E1A, E1B, E2 等の後期遺伝子の発現を制御する初期遺伝子と、L1, L2 などの後期遺伝子に分けられる。初期遺伝子は転写調節因子や DNA 複製に関与する蛋白をコードし、とくに E1A 遺伝子産物はアデノウイルスの他のすべての遺伝子発現に必要である [16]。後期遺伝子はすべてのウイルス粒子の構成蛋白をコードする。DNA 両端に 103~163 bp の逆向き反復配列 (ITR) があり、両末端から 50 bp はアデノウイルス間でよく保存され複製のオリジンともなっている [17]。とくに両末端より 9~22 番目の塩基はヒトアデノウイルスすべてに共通で、ここに DNA-polymerase と末端蛋白前駆体による複合体が結合しゲノムの複製が開始される [18]。

遺伝子導入に使用されるアデノウイルスベクターは初期遺伝子のうち E1 領域 (E1A と E1B 両方) を欠損しており、E1 を安定に発現してい

A. アデノウイルスゲノムDNA (36Kb =100 map unit)



B. アデノウイルスベクター

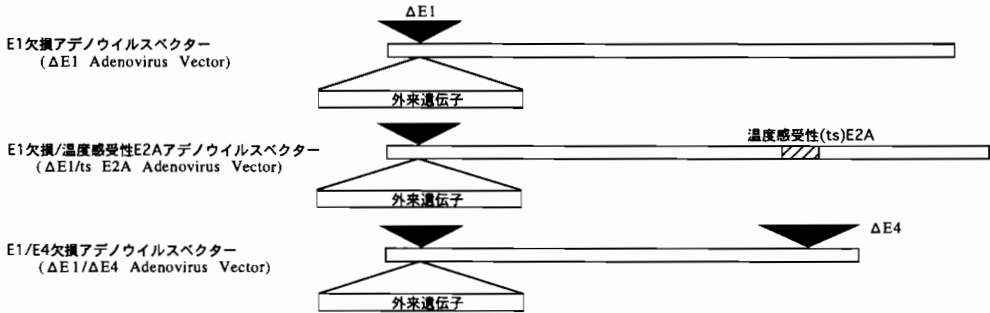


図6. アデノウイルスのゲノム DNA とアデノウイルスベクターの構造

る293細胞(ヒト胎児腎細胞由来)以外では増殖できないようになっている(E1 欠損非増殖型アデノウイルスベクター)。したがって、目的遺伝子を E1 欠損アデノウイルスベクターに組み込んだ後、293細胞内で増幅させることにより組み換えアデノウイルスの産生が可能となる(図7)。こうして作成した組み換えウイルスは、他の培養細胞や動物細胞に容易に感染する。この組み換えウイルスは E1 遺伝子を持たないので、感染後増殖することなく生活環は停止し、外来プロモーターから転写される目的遺伝子のみ発現されることとなる。その発現については、ヒト、サル、ネコ、マウス、ハムスターなどの付着細胞株で100%可能であったという(ただし齧歯類は霊長類に比べ発現が 1/10 程度)。

2) 組み換えアデノウイルスによる遺伝子導入

アデノウイルスベクターには、目的遺伝子の発現プロモーターが他のウイルスベクターと比較して自由に選択できるという大きな特徴がある。強力なプロモーターを用いることで目的遺伝子の発現量を増加させることができれば、ウイルス量を減らして炎症などの副作用を減少さ

E1A, E1B欠損アデノウイルスベクター

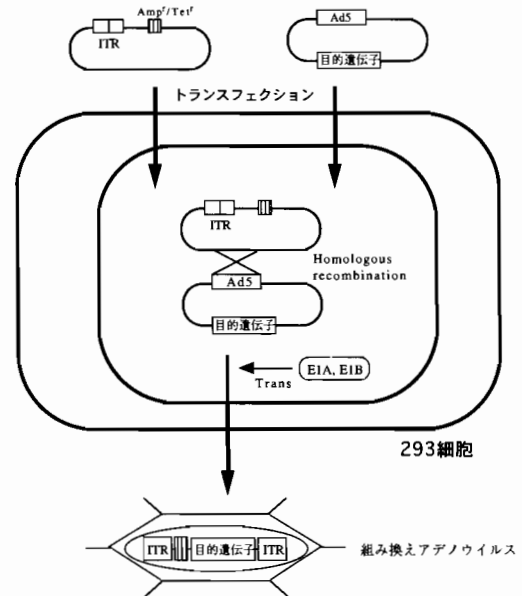


図7. 相同性組み換えによるアデノウイルスベクターの作成

ITR : Inverted Terminal Repeat
 Ad5 : Homologous recombination sequence
 Amp^r/Tet^r : 薬剤耐性遺伝子

せることが期待される。現在までに多くのプロモーターが多種類の細胞で用いられているが、ここでは中枢神経系における実験の成果につい

て述べたい。

ラウス肉腫ウイルス由来のプロモーターを利用した研究で、Le Gal La Salleら[19]はラット海馬、黒質への *in vivo* 投与にて、導入遺伝子(β -galactosidase)の2カ月にわたる発現をマイクログリア、アストロサイト、ニューロンで確認した。Akliら[20]はラットへの 3×10^5 pfu/10 μ l の同様の組み換えウイルス投与にて、アストロサイト、ニューロン、脳室上衣細胞で45日間にわたる導入遺伝子発現を認めた。しかも彼らは全く細胞傷害性を認めていない。Bajocchiら[21]はプロモーターの下流に α 1-アンチトリプシン遺伝子をもつ組み換えウイルスを側脳室内に注入し、側脳室壁の上衣細胞での発現および脳脊髄液中への α 1-アンチトリプシンの分泌を確認した。神経系腫瘍に対しても導入が試みられており、Chenら[22]はラット脳内に移植したC6グリオーマに対して、プロモーターの下流にHTK遺伝子を連結した組み換えウイルスを *in vivo* で投与し高い治療成績を得ている。

また、サイトメガロウイルス由来プロモーターを用いたDavidsonら[23]はプロモーターの下流に β -Galをもつ組み換えウイルスを尾状核に注入し、ニューロン、オリゴデンドロサイトおよび有髄軸索に発現を認めた。Jonesら[24]は同様の組み換えウイルスをマウス網膜細胞に *in vitro*, *in vivo* で導入した。*in vitro* では、網膜細胞はニューロン、グリア細胞と同様に感染4日後でも十分な導入遺伝子の発現を示した。また *in vivo* では眼球内への注入により24時間後、網膜色素上皮とガングリオン細胞に導入遺伝子の発現を認めている。

3) アデノウイルスベクターの改良

今まで述べてきた、いわゆる第一世代アデノウイルスベクターの最大の問題は、細胞毒性・免疫反応であったが、その欠点を補うべくE1欠失に加えて他の初期遺伝子に変異や欠失を加えた第2世代ベクターが工夫されつつある。E1A 遺伝子産物はアデノウイルスの他のすべて

の遺伝子発現に必要であると上述したが、実際にはE1Aタンパクがなくとも僅かながらE2Aタンパクが発現しており、それを宿主の免疫系が認識しウイルス感染細胞を攻撃することによって炎症が生じることが明らかとなった。そこで非許容条件 non-permissive condition (39°C)ではE2A遺伝子も発現しない温度感受性E2A遺伝子を有するベクターが開発された[25]。また、E4タンパクが宿主細胞のタンパク合成を遮断することで細胞毒性が発現することから、E4領域の open reading frame 6 以外の遺伝子を除去して細胞毒性の発現を抑制したベクターなどの報告もされているが、実用化には至っていないのが現状である。

アデノウイルスベクターは、その高い遺伝子導入効率や非分裂細胞への遺伝子導入が可能な点などを考えると、今後もさらに広い分野でますます使用されていくであろう。また最近では、Cre/loxP系[26]を用いて単なる発現ベクターだけでなく、遺伝子操作ベクターとしても応用されてきており、さらなる改良によって副作用の少ない新世代ベクターが開発されることが望まれている。

IV. アデノ随伴ウイルス (adeno-associated virus : AAV)

最近、細胞傷害性の少なさや安定な染色体内への組み込みといった、レトロウイルスの特性を有し、レトロウイルスでは感染できない非増殖性細胞にも感染することができ、ウイルス粒子が安定で *in vivo* 遺伝子導入ができる新しいウイルスベクターとして、AAVベクターが注目されてきている。AAVはヒト、マウスをはじめ多くの動物細胞に感染可能であるが、ヒトへの病原性を持たず、ヒト染色体への組み込みが第19染色体長腕上の特定の領域に限られ[27]、挿入変異の心配がないことから、最も安全なベクターと考えられる。上述のごとくAAVはMoMLV型のレトロウイルスと異なり、筋細胞などの非増殖性細胞にも感染可能であるが、このことはAAVが遺伝子導入ベク

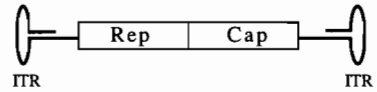
ターとしてより多種類の細胞に遺伝子導入しうる可能性を持つことを意味している。しかしながら、アデノウイルスほどの大きな遺伝子を入れることはできず、約 4.5 Kb までの遺伝子しか AAV ベクターには導入できない。さらに組み換え AAV の作成にはアデノウイルスの共感染が必要で、産生された組み換え AAV は分泌されず核内に蓄積するため、細胞を破壊してウイルスを精製しなければならない。その後、共感染しているアデノウイルスを除去または不活化する操作があり、大量生産が難しいうえ、組み換えウイルスの力価が低いという欠点がある。

1) 組み換え AAV の調製

AAV はパルボウイルスの 1 種の 1 本鎖 DNA ウイルスで、単独で全ての種、組織の細胞への侵入が可能だが、自己増殖ができないため複製にはヘルパーウイルスとして働くアデノウイルスの共感染が必須である [28]。アデノウイルスが存在しない場合、AAV ゲノムは宿主細胞の染色体に組み込まれた状態を維持するが、アデノウイルスが共感染すると AAV ゲノムは染色体より切り出されて、複製を開始する。AAV ゲノムは非構造蛋白質 (Rep) とカプシド蛋白質 (Cap) をコードしており、その両端に 145 bp の ITR (inverted terminal repeat) と呼ばれる T 型のヘアピン構造を持っている (図 8)。この ITR は DNA 合成の primer として作用するほか、パッケージングや宿主染色体への挿入にも必要とされる。AAV ゲノムの染色体への組み込みが、ヒト第 19 染色体長腕 (q13.4-ter) の特定領域に選択的に起こることが知られている。この領域選択的な組み込みに関しては、あまり知見が得られていないが、Rep タンパクが必要であることが知られている。

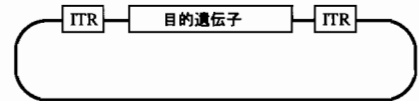
AAV ベクターの産生は、野生型 AAV ゲノムの両端の ITR を残しその間に導入遺伝子を挿入したベクタープラスミドと、野生型 AAV より両端の ITR を取り除いたパッケージングプラスミドを同時に細胞にトランスフェクシ

Wild Type AAV



AAV Vector

a) vector plasmid



b) packaging plasmid

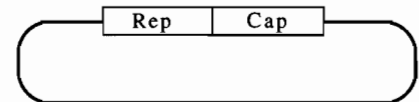


図 8. 野生型 AAV と AAV ベクターの構造
ITR: Inverted Terminal Repeat

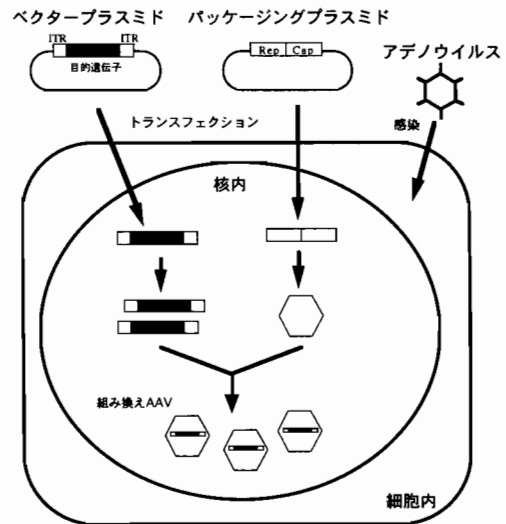


図 9. AAV ベクターの作成
作成された組み換え AAV は核内に蓄積する

ンし、さらにアデノウイルスを感染させることにより行われる (図 9)。このようにして作成した組み換え AAV は病原性もなく広範囲の細胞株に感染可能で、また物理化学的にも安定であり、導入された目的遺伝子は染色体に組み込ま

れる。ただしベクタープラスミド作成の際の条件として、効率良くパッケージングできる DNA の大きさが 2.5~4.5 Kb ぐらいに制限されるということや、組み換えウイルスの調製がやや煩雑で効率が良くないことが難点である。さらに AAV ベクターには Rep タンパクがないため、AAV の特徴である第19染色体長腕への領域選択的な組み込みはなくなり別の場所にも挿入される。

2) 組み換え AAV による遺伝子導入

組み換え AAV が血球系細胞に対する遺伝子導入に有用であるという報告がされている。Walsh ら [29] は、 β -グロビン遺伝子群の約 20 Kb 上流に同定された locus control region (LCR) のコア配列を持つヒト- γ -グロビン遺伝子の組み換え AAV を K562 細胞へ導入し、グロビンの高い発現が得られ、さらに内在性グロビン遺伝子と同様、ヘミンによって発現が調節されたと報告している。ほかにもヒト臍帯血中の造血幹細胞 [30] やヒト末梢血リンパ球への neoR 遺伝子の導入 [31] や CEM や K562 細胞へのアンチセンス遺伝子の導入 [32] などが報告されている。

神経系細胞に対しても報告されていて、Tanenbaum ら [33] はアストロサイトーマ細胞株やヒトオリゴデンドログリオーマ初代培養細胞に AAV とアデノウイルスを共感染し、高い AAV ゲノムの複製を認めたことから、グリア細胞系への導入手段としても有望視している。また Wu ら [34] は AAV 内部プロモーターを用いた組み換え AAV をリボソーム法でニューロblastoma 細胞に導入し、その導入遺伝子産物を検討しニューロンなどへの応用に期待している。

ヒトへの臨床応用としては、現在のところ先天性遺伝子疾患である CFTR (cystic fibrosis transmembrane conductance regulator) の組み換え AAV による遺伝子治療プロトコルが米国で承認されている。

3) AAV ベクターの改良

AAV ベクター作成上の問題点として、組み換え AAV 調製液中には感染性のアデノウイルスが含まれているため、熱処理にてアデノウイルスを失活させることが必要である。しかし、組み換え AAV をアデノウイルスから精製しても、感染性のアデノウイルスやアデノウイルス由来の蛋白質が混入する可能性は否定できない。この欠点を克服すべく AAV の複製に必要なと思われるアデノウイルス初期遺伝子をベクタープラスミドと同時に細胞にトランスフェクションすることにより、アデノウイルスの感染を必要としない AAV ベクター作成法も考案されている [35]。この方法により、組み換え AAV 液に含まれるアデノウイルスによる感染や投与局所の炎症などの副作用が解決されることが期待される。

腫瘍細胞への遺伝子導入を行う場合、組み換えレトロウイルスを用いる場合には増殖性を持つ腫瘍細胞にしか感染しないことが好都合であったが、組み換え AAV を用いる場合には正常細胞を含む全ての細胞に感染する可能性があるため、癌組織特異的プロモーターによる組織特異的発現を行うことが必要である。最近、Su ら [36] は AFP 陽性肝癌細胞に対する AFP プロモーターやエンハンサーを用いて、肝癌細胞特異的な遺伝子発現を報告している。

現在まで、レトロウイルスやアデノウイルスと比較して、AAV に関する基礎的研究は十分になされていないため未知な点が多い。そのため広く普及するには今しばらくの時間が必要と思われるが、AAV ベクターはレトロウイルスとアデノウイルスの長所を合わせ持った性質を有していると考えられることから、その一刻も早い実用化が待たれる。

参考文献

- 1) Miller AD & Rosman GJ: Improved retroviral vectors for gene transfer and expression. *Biotechniques* 7: 980-990, 1989
- 2) Korman AJ, Frantz JD & Mulligan RC: Expression of human class II major histocompatibility

- complex antigens using retrovirus vectors. Proc Natl Acad Sci USA **84**: 2150-2154, 1987
- 3) Emi N, Friedmann T & Yee JK: Pseudotype formation of murine leukemia virus with the G protein of vesicular stomatitis virus. J Virol **65**: 1202-1207, 1991
 - 4) Burns JC, Friedmann T & Yee JK: Vesicular stomatitis virus G glycoprotein pseudotyped retroviral vectors: Concentration to very high titer and efficient gene transfer into mammalian and nonmammalian cells. Proc Natl Acad Sci USA **90**: 8033-8037, 1993
 - 5) Kotani H, Newton PB 3rd & McGarrity GJ: Improved methods of retroviral vector transduction and production for gene therapy. Hum Gene Ther **5**: 19-28, 1994
 - 6) Chuck AS & Palsson BO: Consistent and high rates of gene transfer can be obtained using flow-through transduction over a wide range of retroviral titers. Hum Gene Ther **7**: 743-750, 1996
 - 7) Kasahara N, Dozy AM & Kan YW: Tissue-specific targeting of retroviral vectors through ligand-receptor interaction. Science **266**: 1373-1376, 1994
 - 8) Valsesia-Wittmann S, Drynda A & Cosset FL: Modification in the binding domain of avian retrovirus envelope protein to redirect the host range of retroviral vectors. J Virol **68**: 4609-4619, 1994
 - 9) Obaru K, Shimada T & Takatsuki K: Gene therapy for adult T cell leukemia using human immunodeficiency virus vector carrying the thymidine kinase gene of herpes simplex virus type 1. Hum Gene Ther **7**: 2203-2208, 1996
 - 10) Shimada T, Fujii H & Nienhuis AW: Targeted and highly efficient gene transfer into CD4⁺ cells by a recombinant human immunodeficiency virus retroviral vector. J Clin Invest **88**: 1043-1047, 1991
 - 11) Miyake K, Tohyama T & Shimada T: Two-step gene transfer using an adenoviral vector carrying the CD4 gene and human immunodeficiency viral vectors. Hum Gene Ther **7**: 2281-2286, 1996
 - 12) Miyao Y, Shimizu, K & Ikenaka K: Selective expression of foreign genes in glioma cells: Use of the mouse myelin basic protein gene promoter to direct toxic gene expression. J Neurosci Res **36**: 472-479, 1993
 - 13) Kuriyama S, Yoshikawa M & Mikoshiba K: A potential approach for gene therapy targeting hepatoma using a liver-specific promoter on a retroviral vector. Cell Struct Funct **16**: 503-510, 1991
 - 14) Couture LA, Mullen CA & Morgan RA: Retroviral vectors containing chimeric promoter/enhancer elements exhibit cell-type-specific gene expression. Hum Gene Ther **5**: 667-677, 1994
 - 15) 鐘ヶ江裕美, 徳田千賀志, 斎藤 泉: アデノウイルスベクターと遺伝子治療. 実験医学 **12**: 316-322, 1994
 - 16) Berk AJ: Adenovirus promoters and E1A transactivation. Annu Rev Genet **20**: 45-79, 1986
 - 17) Challberg MD & Kelly TJ: Animal virus DNA replication. Annu Rev Biochem **58**: 671-717, 1989
 - 18) Chen M, Mermod N & Horwitz MS: Protein-protein interactions between adenovirus DNA polymerase and nuclear factor 1 mediate formation of the DNA replication preinitiation complex. J Biol Chem **265**: 18634-18642, 1990
 - 19) Le Gal La Salle G, Robert JJ & Mallet J: An adenovirus vector for gene transfer into neurons and glia in the brain. Science **259**: 988-990, 1993
 - 20) Akli S, Caillaud C & Peschanski MR: Transfer of a foreign gene into the brain using adenovirus vectors. Nature Genet **3**: 224-228
 - 21) Bajocchi G, Feldman, SH & Mastrangeli A: Direct in vivo gene transfer to ependymal cells in the central nervous system using recombinant adenovirus vectors. Nature Genet **3**: 229-234, 1993
 - 22) Chen SH, Shine HD & Woo SL: Gene therapy for brain tumors: regression of experimental gliomas by adenovirus-mediated gene transfer in vivo. Proc Natl Acad Sci USA **91**: 3054-3057, 1994
 - 23) Davidson BL, Allen ED & Roessler BJ: A model system for in vivo gene transfer into the central nervous system using an adenoviral vector. Nature Genet **3**: 219-223, 1993
 - 24) Jomary C, Piper TA & Jones SE: Adenovirus-mediated gene transfer to murine retinal cells in vitro and in vivo. FEBS Lett **347**: 117-122, 1994
 - 25) Engelhardt JF, Yang Y & Wilson JM: Direct gene transfer of human CFTR into human bronchial epithelia of xenografts with E1-deleted adenoviruses. Nature Genet **4**: 27-34, 1993
 - 26) Barinaga M: Knockout mice: round two. Science **265**: 26-28, 1994
 - 27) Samulski RJ, Zhu X & Hunter LA: Targeted integration of adeno-associated virus (AAV) into human chromosome 19. EMBO J **10**: 3941-3950, 1991
 - 28) Muzyczka N: Use of adeno-associated virus as a general transduction vector for mammalian cells. Curr Top Microbiol Immunol **158**: 97-129, 1992
 - 29) Walsh CE, Liu JM & Samulski RJ: Regulated high level expression of a human gamma-globin gene introduced into erythroid cells by an adeno-associated virus vector. Proc Natl Acad Sci USA **89**: 7257-7261, 1992
 - 30) Zhou SZ, Cooper S & Broxmeyer HE: Adeno-associated virus 2-mediated high efficiency gene transfer into immature and mature subsets of

- hematopoietic progenitor cells in human umbilical cord blood. *J Exp Med* **179**: 1867-1875, 1994
- 31) Muro-Cacho CA, Samulski RJ & Kaplan D: Gene transfer in human lymphocytes using a vector based on adeno-associated virus. *J Immunother* **11**: 231-237, 1992
- 32) Chatterjee S, Johnson PR & Wong KK Jr: Dual-target inhibition of HIV-1 in vitro by means of an adeno-associated virus antisense vector. *Science* **258**: 1485-1488, 1992
- 33) Tanenbaum L, Darling JL & Hooghe-Peters E: Adeno-associated virus (AAV) as a vector for gene transfer into glial cells of the human central nervous system. *Gene Ther* **1**: S80, 1994
- 34) Wu P, Ziska D & Meyer EM: Differential neuropeptide Y gene expression in post-mitotic versus dividing neuroblastoma cells driven by an adeno-associated virus vector. *Mol Brain Res* **24**: 27-33, 1994
- 35) Colosi P, Elliger S & Kurtzman GJ: AAV vectors can be efficiently produced without helper virus. 第2回日本遺伝子治療学会要旨集 (#008), 1996
- 36) Su H, Chang JC & Kan YW: Selective killing of AFP-positive hepatocellular carcinoma cells by adeno-associated virus transfer of the herpes simplex virus thymidine kinase gene. *Hum Gene Ther* **7**: 463-470, 1996