

平成22年 6月11日現在

研究種目：若手研究(B)
 研究期間：2008～2009
 課題番号：20791131
 研究課題名（和文） アデノ随伴ウイルスベクターを用いた胎児遺伝子治療の臨床応用のための基礎研究
 研究課題名（英文） Fundamental researches for clinical application of the fetal gene therapy using an adeno-associated virus vector
 研究代表者
 小倉 剛 (OGURA TSUYOSHI)
 筑波大学・大学院人間総合科学研究科・講師
 研究者番号：40451702

研究成果の概要（和文）：病気の治療として、その原因である遺伝子のレベルで治療するという遺伝子治療において、安全性の面から注目されている様々な型（血清型）のアデノ随伴ウイルス(AAV)を基にした AAV ベクター（治療遺伝子の運び屋）のうち、胎児遺伝子治療に適した型を検討したところ、AAV1 型ベクターであることが判明した。これらの結果をさらに発展させることで胎児遺伝子治療の臨床応用が期待された。

研究成果の概要（英文）：“Gene therapy” treats disease at a genetic level. An AAV vector attracts attention from a safe aspect, and there are various models (serotype). I investigated serotype of the AAV vector which was suitable for fetal gene therapy. It became clear that an AAV1 type vector was suitable. Clinical application of fetal gene therapy was expected by developing these results.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2009 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：産科学、胎児治療学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・産婦人科学

キーワード：アデノ随伴ウイルス(AAV)ベクター、血清型、胎児遺伝子治療、

1. 研究開始当初の背景

近年の遺伝子工学・分子生物学の進歩により、多くの病気が遺伝子レベルの異常によって引き起こされていることが明らかとなり、それに伴い病気を遺伝子レベルで治療するという遺伝子治療が注目され、その研究がめざましく進んでいる。しかし遺伝子導入効率の

低さから期待されたほどの具体的成果は上がっていない。遺伝子導入効率を上げるため、成人では導入しにくい組織や臓器に治療遺伝子を導入できる可能性があり、比較的少量のベクターで有効な導入遺伝子発現が期待できると考えられる胎児・新生児遺伝子治療に着目し、ヒトへの病原性がないとされ、

その安全性と導入遺伝子の長期発現の可能性から注目されつつあるアデノ随伴ウイルス (AAV) を用いた AAV ベクターを用いた胎児・新生児遺伝子治療における基礎研究を行い、成人への遺伝子治療から胎児・新生児遺伝子治療へシフトすることで、より高い遺伝子治療効果が得られ、臨床遺伝子治療研究で治療効果を得るために必要とされる莫大なベクター量を引き下げられる可能性を示した (Ogura T, et al. Utility of intraperitoneal administration as a route of AAV serotype 5 vector-mediated neonatal gene transfer. J Gene Med. 2006 Aug;8(8):990-7.)。

この結果を基に臨床応用を前提に研究を進展させるため、ヒトにおける安全性と有効性の検討が不可欠である。安全性に関しては、胎児遺伝子治療を前提にした場合、妊婦における安全性の検証は不可欠である。また最も研究の進んでいる一方、大半の成人がその抗体を保有しているといわれている AAV2 型以外の血清型を用いた AAV ベクターの開発・応用が期待されている。しかし 2 型以外の血清型の妊婦における抗体保有率については明らかではない。

2. 研究の目的

胎児遺伝子治療として実際の臨床応用に発展させるために、

(1) アデノ随伴ウイルス (AAV) ベクターを用いた際のヒト (妊婦・胎児) における安全性について、AAV ベクターのベースとなる AAV の妊婦・胎児に対する病原性の有無を検討すること

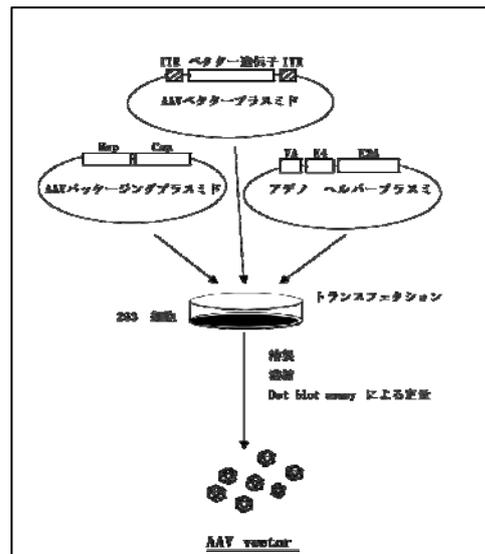
(2) 臨床応用の際に、有効な AAV ベクター血清型を選択するため、妊婦での各血清型の AAV 抗体保有率を検討すること。

3. 研究の方法

(1) 羊水検査をうける妊婦に随時インフォームド・コンセントを行い、同意の得られた妊婦より余剰羊水採取及び採血を行う。血液は血球と血清、血漿のかたちで -80°C で保存、羊水は遠心後のペレットと上清にわけて -80°C にて保存する。適宜、羊水のペレットから DNA を抽出し、4°C にて保存する。羊水中のウイルスの存在を nested PCR を用いて確認し、ウイルスの有無と妊娠期間中の妊婦の有害事象を検討する。

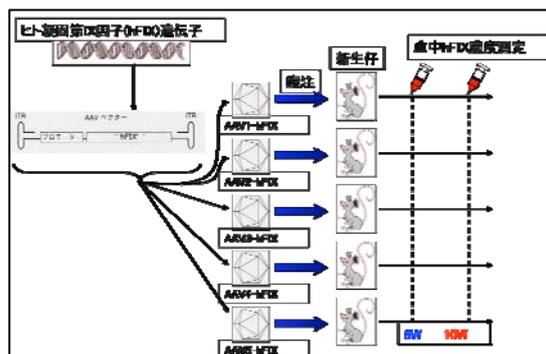
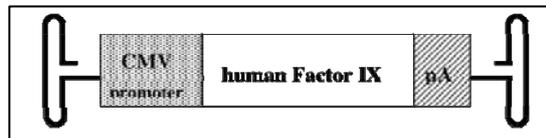
(2) 採取・保存された妊婦血液を用い、血中 AAV 抗体測定を行うため、感度の高い ELISA 法を用いる。AAV capsid を抗原とするため、AAV ベクターを作成 (アデノウイルスフリー・トリプルプラスミド トランスフェクシ

ョンプロトコール) してその capsid を代用する。

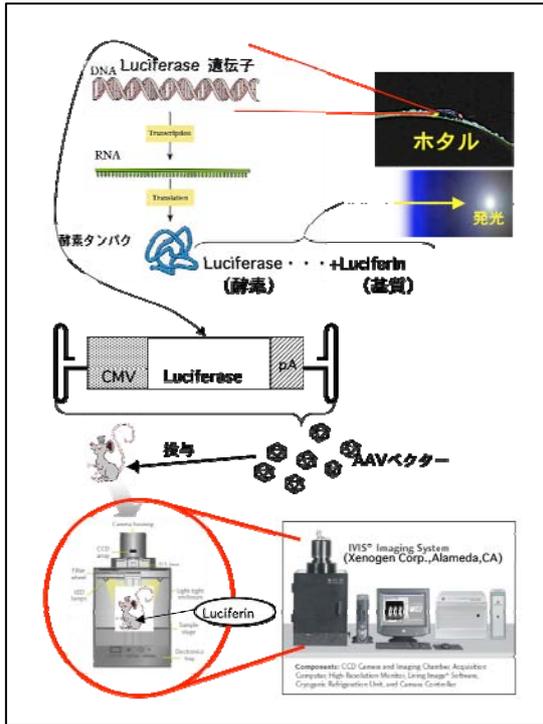


(2)'

① ヒト胎児と同程度の成熟度合いと考えられているマウス新生仔期の腹腔内投与における効果的な AAV ベクターの血清型を検討するため、ヒト第 IX 因子 (hFIX) 遺伝子を組み込んだそれぞれ 1-5 型の AAV ベクターを作成し新生仔マウスへ腹腔内投与した後、血中 hFIX を測定した。



②効果的であった血清型のベクターに Luciferase 遺伝子を組み込んだベクターを作製し、新生仔マウスへ腹腔内投与した後、bioluminescence assay により導入遺伝子発現を解析した。



③フェニルケトン尿症の疾患モデルマウス (PAH^{enu2}) を用い、マウス型フェニルアラニン水酸化酵素遺伝子と GTP シクロヒドラーゼ I 遺伝子を同時に組み込んだ AAV1 型ベクターを作製し、新生仔 PAH^{enu2} に腹腔内投与した後、血中フェニルアラニン (Phe) 濃度を生後 1 年にわたり経時的に測定した。

4. 研究成果

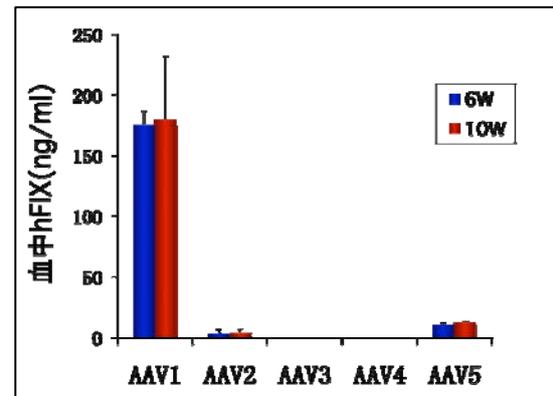
(1) 当初 AAV の rep 領域と cap 領域をブリッジするようなプライマーを 2 組用いて nested PCR を行ったが、プライマーダイマーができてしまい、平成 20 年度、平成 21 年度と条件を変更し予備実験を繰り返したものの正確なウイルスの検出は困難であった。

(2) ELISA 法を用いた血中 AAV 抗体測定法は、予備実験より精度の高い方法として確立できたものの、精度の高い複数検体のアッセイには実験計画に対し、予想以上の AAV カプシドが必要であることが判明した。また、平成 20 年度途中でフリーザーが故障し、それまで -80°C にストックしておいた検体がすべて使用不能になってしまった。研究前からすでに数百の試料が凍結保存されていたため、これらを用いることで検体採取の手間が相当省け、効率的に研究が遂行できると考えていたため、このアクシデントにより計画期間中に目的 (1) 及び (2) の一部を達成することは不可能となった。ただし、(2) 目的の、臨床応用の際に、有効な AAV ベクター血清型を選択することに関しては、研究方法 (2)' を行う

ことで達成できた。

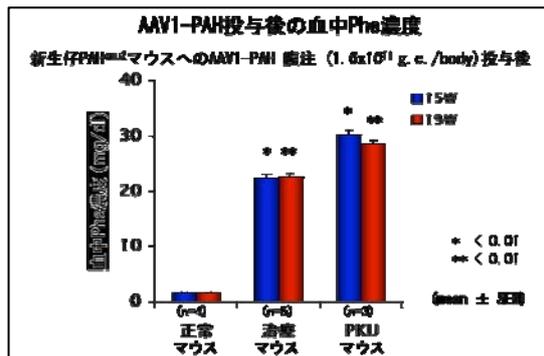
(2)'

① 新生仔期の腹腔内投与においては AAV1 型ベクターが最も効果的であった。

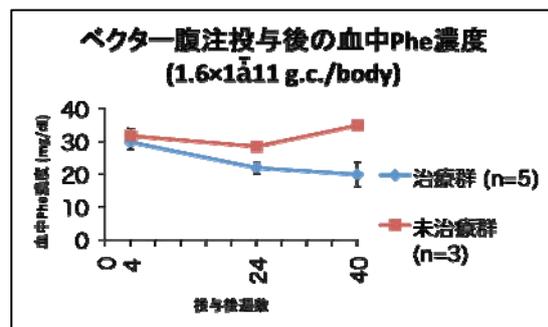


② AAV1 型ベクターの腹腔内投与では、導入遺伝子発現は主に腹腔周囲の筋組織であることが明らかとなった。

③ 新生仔 PAH^{enu2} への腹腔内投与にて、十分な治療域には達しなかったものの、有意な血中 Phe 濃度の低下を認めた。



また、長期的に見ると、血中 Phe 濃度は、ベクター投与から生後 19 週にかけて、 $49.8 \pm 1.0 \text{ mg/dl}$ から $22.5 \pm 0.8 \text{ mg/dl}$ に徐々に低下した。その後も生後 1 年間にわたり再上昇せず、1 年後の血中 Phe 濃度は、 $19.9 \pm 2.2 \text{ mg/dl}$ であった (mean \pm SEM)。



研究成果の意義として、当初目的としていた、妊婦での AAV の安全性を、妊婦の AAV 感染の有無とその臨床的有害事象から検討すること及び妊婦での各血清型の AAV 抗体保有率を検討することより抗体の影響の少ない AAV ベクターの血清型を絞り込むことは出来なかったが、臨床応用を目標とした疾患モデルマウスでの胎児（新生仔）遺伝子治療研究で、AAV1 型の腹注投与が有用であることが明らかとなった。また長期効果についても明らかとなった。これは今後の胎児遺伝子治療において、AAV1 型ベクターを用いることが戦略的に有効である可能性を示した。AAV1 はそもそもサルから見つかり、ヒトでの抗体保有率は少ない可能性があり、ヒトの大半がその抗体をもっているとされる AAV2 より有用である可能性が高く、今後抗体保有率の検討も AAV1 型に的を絞れば効率がよいことが判明した。これらの実験結果は第 60 回日本産婦人科学会学術講演会でも高く評価され高得点演題となった。また本研究はフェニルケトン尿症 (PKU) モデルマウスを用いた治療研究でもあるが、これまでの PKU 遺伝子治療は静注によるベクター投与が常識とされ、ベクターの標的臓器も肝臓とされていたが、本研究ではベクターは腹腔内投与され、標的臓器は筋組織であったが実際に、十分ではないものの有意な治療効果が長期に *in vivo* で確認された初めての研究である。このことは、今後の PKU 遺伝子治療に新たな可能性を示した。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[学会発表] (計 2 件)

- ① 小倉 剛、筋組織を標的とする AAV ベクターを用いた「フェニルケトン尿症」に対する新生仔遺伝子治療の長期的効果、第 61 回日本産科婦人科学会学術講演会、2009 年 4 月 5 日、京都

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小倉 剛 (OGURA TSUYOSHI)
筑波大学・大学院人間総合科学研究科・
講師
研究者番号：40451702