

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和元年6月17日現在

機関番号：12102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K07081

研究課題名(和文) 経口免疫寛容の誘導による外来遺伝子発現法の検討

研究課題名(英文) IMPROVED GENE TRANSDUCTION WITH RECOMBINANT AAV FOLLOWING IMMUNE TOLERANCE.

研究代表者

石井 亜紀子 (Ishii, Akiko)

筑波大学・医学医療系・講師

研究者番号：10400681

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：筋ジストロフィーの遺伝子治療を将来の目標に、アデノ随伴ウイルスベクター(AAV)を用いた遺伝子導入法を検討するため、サルの骨格筋に外来遺伝子を組み込んだAAVを筋肉内に投与する実験を行った。外来遺伝子やAAVに対する免疫反応により遺伝子の発現量や期間が短縮するのを予防するため、ヒト歯髄幹細胞を投与し、免疫寛容を誘導することに成功した。当初、口からの免疫寛容誘導を考えたが、サルに食べさせることが困難であったため、静脈注射で免疫寛容誘導を行った。AAVで導入した外来遺伝子の発現を48週後も確認でき、遺伝子治療を行う上で、免疫寛容誘導により導入した遺伝子の発現期間を延長可能であることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

Duchenne型筋ジストロフィーは、根本的な治療法がなく、遺伝子治療法の確立が望まれている。本研究は組換えAAVが筋ジストロフィーの遺伝子治療に用いることができるかどうかを検討する研究であり、ヒトの遺伝子治療の基礎的研究として重要である。iPS細胞を使用しても、何らかの方法により効率的に欠失している遺伝子の導入が必要である。AAVは病原性がないこと、長期発現が可能であることからもっとも有望な遺伝子導入法である。本研究で組換えAAVの安全性および免疫寛容の誘導による効果の持続法が確立されれば、他の遺伝性疾患に対する遺伝子治療も選択肢が広がり、遺伝子疾患患者にとって福音であり社会的意義は大きい。

研究成果の概要(英文)：Recombinant adeno-associated virus (rAAV) is a promising viral vector for gene therapy of Duchenne muscular dystrophy (DMD). Emergence of circulating dystrophin-specific T cells was reported in DMD patients treated with rAAV. Therefore, immunomodulation is a necessary requirement for successful gene therapy. Immune tolerance induction is immunosuppressive method and we used it as a novel alternative for this purpose. Our research consist on inducing immune tolerance using dental pulp stem cells (DPSCs) and the effects on the AAV-mediated expression of LacZ in the skeletal muscle of cynomolgus monkey. Without DPSCs, LacZ expression was not detected at any point of the observation period. Using DPSCs, LacZ expression was successfully detected at 48 weeks after the injection. DPSCs administration was able to reduce immune response to rAAV9 and LacZ. This DPSCs-assisted transduction strategy can enhance the therapeutic benefits of AAV-mediated gene therapy of DMD.

研究分野：遺伝子治療

キーワード：遺伝子治療 免疫寛容 筋ジストロフィー アデノ随伴ウイルス カニクイザル

様式 C - 19 , F - 19 - 1 , Z - 19 , CK - 19 ( 共通 )

### 1 . 研究開始当初の背景

Duchenne 型筋ジストロフィー ( DMD ) は , 現在根本的な治療がなく , 遺伝子治療法の確立が望まれている . 我々は , 骨格筋に対する効率的な遺伝子導入が可能な組換え AAV に着目した . AAV ベクターの場合 , 導入可能な遺伝子が 4.9 kb に限られるという制限がある . そこで我々は , ジストロフィンの機能を備えたまま小型化したマイクロジストロフィン遺伝子を得る研究を進めてきた ( Ishii A et al 日本臨床 2007 ) . トランスジェニックマウスを用いた研究から , 小型の治療用遺伝子の候補を得て , AAV ベクターを用いて病態モデルのマウス骨格筋に導入したところ , 骨格筋や心筋への遺伝子導入による良好な治療成績が得られた ( Sakamoto M et al . BBRC 2002 ) が , 中型の病態モデルである筋ジストロフィー犬骨格筋では , 導入遺伝子産物の発現が低く , 強い細細胞浸潤が観察された ( Yuasa K et al . Gene Ther 2007 ) . その原因として , イヌ骨格筋では血清型によっては強い免疫応答が誘導され , 免疫応答の制御が重要であることを見出した ( Ohshima S et al . Mol Ther , 2009 ) . ただし , イヌは元来 AAV の自然宿主でないために強い免疫応答を生じている可能性があり , また , 我々の研究は DMD の治療を目的としていることから , ヒトにできるだけ近い Background を持つ動物で安全性を検定する必要がある . そこで , 我々が治療目標にしているヒトに近いサルでの AAV ベクターの安全性と遺伝子導入発現効率の検定を行うことを目的として , 平成 17 年度から AAV2 型ベクターを用いてカニクイサル骨格筋への遺伝子導入を行った . その結果 , LacZ 遺伝子発現 AAV ベクター投与群では発現効率の高い個体と低い個体が存在し , マイクロジストロフィン遺伝子発現 AAV ベクター投与群では , PCR にてベクターゲノムを検出したものの , ウエスタンブロットでは発現は発現が確認されなかった ( 石井ら 第 16 回日本遺伝子治療学会 2010 , 13<sup>th</sup> ASGCT 2012 ) . その原因として , 中和抗体の有無による導入遺伝子発現の個体差や , 用いたマイクロジストロフィン遺伝子の構造による発現効率の低下が考えられた ( 石井ら 第 18 回日本遺伝子治療学会 2012 , 15<sup>th</sup> ASGCT , 2012 ) . 8 型 , 9 型の AAV ベクターを投与したところ , LacZ 遺伝子発現 AAV ベクター投与群では 16 週まで , マイクロジストロフィン遺伝子発現ベクター投与群では 24 週まで発現が認められたが , 投与部位を中心にして細胞浸潤が認められた ( 図 1 , 2A-D 石井ら 第 19 回日本遺伝子治療学会 2013 ) . 局所の免疫反応の存在や中和抗体陰性個体は 2 / 4 頭中 5 頭であり , 80 % は抗体を保有していることから , 免疫抑制剤の使用が必要と考えられた . そこで , 免疫抑制剤としてカルシニューリンに結合し IL-2 発現を阻害するタクロリムスを使用し , LacZ 遺伝子発現 8 型 AAV ベクター投与後 24 週間の長期発現に成功した ( 石井ら 第 20 回日本遺伝子治療学会 2014 , 2015 , 投稿準備中 ) . サルにおいても抗体保有率が高率であることから , ヒトにおいても同様に抗体を保有している可能性が高いと考えられる . しかし , 免疫抑制剤を実際の DMD 患者に投与することを考えると , 死因となりうる肺炎をはじめとする感染の危険性を増大させることが予想され , 臨床応用は困難である . したがって , 免疫寛容を導入することを着想するに至った

### 2 . 研究の目的

DMD は全身の筋変性 , 壊死を主体とし , ほとんどが 30 歳前に死亡する重症な X 染色体連鎖性疾患である . DMD 患者でのジストロフィン遺伝子補充療法において , ジストロフィンに対する抗体産生と発現への影響が報告され , 今後 , 遺伝子治療のみならず細胞治療や薬物治療においても , 回復した遺伝子産物に対する免疫抑制技術を開発することが急務である . 我々はサル骨格筋において免疫抑制剤使用による遺伝子発現効率の改善を明らかにし報告した . 本研究では , ヒト遺伝子・細胞治療への応用を目標に , カニクイザルを用いて経口で減感作による免疫寛容を誘導することにより , 免疫抑制剤を用いずに組換え AAV の骨格筋での発現を持続させる新規技術を開発しその安全性と発現効率の改善を検討することを目的とする .

### 3 . 研究の方法

#### ( 1 ) 中和抗体の測定によるサルの選別

AAV に対する抗体のないカニクイザル ( 3 - 4 歳 ) を選別した .

#### ( 2 ) ヒト歯髄類似細胞の調整

免疫寛容の誘導法として , 当初計画では経口免疫寛容導入を予定したが , ヒト歯髄類似細胞を用いた免疫寛容誘導に切り替えて実験を行った . 経口での投与がサルでは困難であったためである . ヒト歯髄類似細胞は間葉系幹細胞の一種であり , 間葉系幹細胞はナイーブ T 細胞から制御性 T 細胞を誘導することで免疫寛容を誘導することが明らかとなっている . ヒト歯髄類似細胞を免疫原との同時投与により , 有効な免疫寛容を得ることができる . 経口減感作と異なり , 確実に投与できる点も利点であり , サルへの投与は本研究が最初である .

#### ( 3 ) 発現ベクターの大量調整

LacZ 遺伝子 AAV 発現ベクターである AAV9-CMV-LacZ および AAV8CMVLacZ の大量調整を行った . その際に , 効率的にベクターを得る方法について論文化した . 歯髄類似細胞は共同研究をしている国内製薬会社から供与を受けた . AAV9-CMV-LacZ 投与量は , これまでにサルで検討した結果から  $1 \times 10^{13} \text{vg/muscle}$  とした .

#### ( 4 ) 発現ベクターの投与とサンプリング

経時的に末梢血リンパ球を採取し , 抗原暴露後のインターフェロン 産生能の減弱を確認することにより免疫寛容の誘導を確認した . カニクイザル 3 頭に対し , 歯髄類似細胞と AAV9-CMV-LacZ を経静脈投与し , その 7 日後に再度歯髄類似細胞を投与し , 翌日に AAV9-CMV-LacZ を筋肉内注射した . カニクイザルの左右の上腕二頭筋 , 前脛骨筋の計 4 箇所 に LacZ 遺伝子組換え AAV ベクターを直接注入した . LacZ 遺伝子発現 AAV9 ベクター投与群 2 頭 , LacZ 遺伝子発現 AAV8 ベクター投与群 1 頭 , コントロール 2 頭を用いた . 導入 8 , 16 及び 24 週後に筋組織の生検を , 42 週後に安楽死後のサンプリングをそれぞれ行い , 同時に各時点で採血も実施した . AAV ベクターの投与 , 採血及び生検は塩酸ケタミンによる麻酔下で行った . 肝・脾・膵 , 心・横隔膜・脳 , 大動脈 , 腸などの臓器のサンプリングは , ペントバルビタールナトリウム深麻酔下に放血死させた後に実施した .

#### ( 5 ) 解析

LacZ の発現を PCR 法 , ウェスタンブロット法及び免疫組織化学染色法を用いて解析した . 発現細胞のカウントなどの統計解析は , KEYENCE BZ-9000(BIORAVO) all-in-one fluorescence microscope と解析ソフト BZ-H3A BZX analysis application を用いた .

### 4 . 研究成果

ウイルスの大量調整法について , 改善した点について , 学会発表および論文掲載をおこなった . 免疫寛容誘導実験については , 免疫組織化学染色では , DPSC なしの場合 , AAV8-CMV-LacZ および AAV9-CMV-LacZ の発現は観察期間のどの時点でも検出されず , 多数の細胞浸潤が見られた . DPSC を用いて免疫寛容を導入した場合は , AAV8-CMV-LacZ および AAV9-CMV-LacZ の発現は炎症性細胞浸潤なしに注射後 48 週まで検出可能であった . 骨格筋での発現は AAV8-CMV-LacZ 投与群より AAV9-CMV-LacZ 投与群のほうが高かった . 観察期間中 , 有害事象は認められなかった . 本成果については学会発表し , 現在 , 論文投稿中である .

### 5 . 主な発表論文等

[ 雑誌論文 ] ( 計 2 件 )

( 1 ) Tomono T, Hirai Y, Okada H, Miyagawa Y, Adachi K, Sakamoto S, Kawano Y, Chono H, Mineno J, Ishii A, Shimada T, Onodera M, Tamaoka A, Okada T. Highly Efficient Ultracentrifugation-free Chromatographic Purification of Recombinant AAV Serotype 9. Mol Ther Methods Clin Dev. 11:180-190, 2018.

( 2 ) Tomono T, Hirai Y, Okada H, Adachi K, Ishii A, Shimada T, Onodera M, Tamaoka A, Okada T. Ultracentrifugation-free chromatography-mediated large-scale purification

of recombinant adeno-associated virus serotype 1 (rAAV1). Mol Ther Methods Clin Dev. 3:15058,2016.

〔学会発表〕(計5件)

(1) Ishii A, Hayashita-Kino H, Okada H, Shin JH, Okada T, Takeda S: Immune response elicited by gene therapy using adeno-associated virus (AAV) vector for muscular dystrophy. 第24回JSGCT学会年次学術集會. 2018年7月 東京

(2) Tomono T, Hirai, Y, Okada H, Miyagawa Y, Adachi K, Ishii A, Shimada T, Tamaoka A, Okada T. Refinements of rAAV8 Purification Protocol with Chromatography Technology. 21<sup>st</sup> Annual Meeting of the American Society of Gene and Cell Therapy (Chicago, USA), May, 2018

(3) Ishii A, Okada H, Hayashita-Kino H, Shin JH, Okada T, Takeda S: rAAV8/9-mediated gene therapy for muscular dystrophy; Tacrolimus ameliorates immuneresponce in normal primates. 第23回JSGT学会年次学術集會. 2017年7月 岡山

(4) Ishii A, Okada H, Hayashita-Kinoh H, Shin JH, Okada T, Takeda S: Effective microdystrophin expression in non-human primate muscle with AAV type8 vectors under immune suppression. 22<sup>nd</sup> Annual Meeting of JSGCT 2016年7月 東京

(5) Tomono T, Okada H, Adachi K, Ishii A, Shimada T, Onodera M, Tamaoka A, Okada T. Ultracentrifugation- Free Chromatography-Mediated Large-Scale Purification of Recombinant Adeno-Associated Virus Serotype 1 (rAAV1) and rAAV9 from the Serum-Free Culture Supernatant 19<sup>th</sup> Annual Meeting of the American Society of Gene and Cell Therapy (Washington DC, USA), May, 2016

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕

ホームページ等

なし

## 6. 研究組織

### (1) 研究分担者

研究分担者氏名：喜納裕美

ローマ字氏名：Hiromi Hayashita-Kinoh

所属研究機関名：日本医科大学

部局名：生化学・分子生物学(分子遺伝学)

職名：助教

研究者番号(8桁): 60532728

研究分担者氏名：岡田浩典

ローマ字氏名：Hironori Okada

所属研究機関名：日本医科大学

部局名：医学(系)研究科

職名：研究員

研究者番号(8桁): 80416271

(2)研究協力者

研究協力者氏名：岡田 尚己

ローマ字氏名：Takashi Okada

研究協力者氏名：武田 伸一

ローマ字氏名：Sin'ichi Takeda

研究協力者氏名：山海 直

ローマ字氏名：Tadashi Sankai

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。